

Auswirkungen der parasitischen Lebensweise  
auf die Plastidengenome von  
*Cuscuta reflexa* und *Cuscuta gronovii*



DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Helena Tamara Funk  
aus München

Marburg/Lahn 2007

Vom Fachbereich Biologie der  
Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Uwe G. Maier  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus Lingelbach

30.10.2007

Prof. Dr. Alfred Batschauer  
Prof. Dr. Paul Galland

Tag der mündlichen Prüfung am:

12.11.2007

Meiner Familie  
und meinen Freunden

## PUBLIKATIONEN

Teile dieser Arbeit sind publiziert in:

Funk HT, Berg S, Krupinska K, Maier UG and Krause K. Complete DNA sequences of the plastid genomes of two parasitic flowering plant species, *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta gronovii*. BMC Plant Biology 2007, 7:45

Weitere Publikationen:

Tillich M, Funk HT, Schmitz-Linneweber C, Poltnigg P, Sabater B, Martin M and Maier RM. Editing of plastid RNA in *Arabidopsis thaliana* ecotypes. The Plant Journal 2005, 43: 708-71

Funk HT, Poltnigg P, Schmitz-Linneweber C, Tillich M: Transcript polishing in higher plant plastids by RNA editing. Endocytobiosis and Cell Research 2004, 15:491-503

## INHALTSVERZEICHNIS

Publikationen .....	1
Inhaltsverzeichnis .....	2
Abbildungsverzeichnis .....	5
Tabellenverzeichnis .....	6
1. Einleitung .....	7
1.1 Die Evolution der Plastide .....	7
1.2 Das Plastidengenom .....	8
1.3 Die plastidäre Genexpression .....	10
1.3.1 Plastidäre Transkription .....	10
1.3.2 RNA Spleißen in Plastiden .....	12
1.3.3 Plastidäre RNA Edierung .....	14
1.4 Parasitische Blütenpflanzen .....	17
1.5 Zielsetzung .....	20
2. Material und Methoden .....	21
2.1 Material .....	21
2.1.1 Pflanzenmaterial .....	21
2.1.2 Molekularbiologische Kits .....	21
2.1.3 Enzyme .....	21
2.1.4 DNA-Marker .....	22
2.1.5 Geräte .....	22
2.1.6 Software .....	23
2.1.7 Chemikalien und Verbrauchsmittel .....	23
2.2 Methoden .....	23
2.2.1 Extraktion von DNA .....	23
2.2.2 Extraktion von RNA .....	24
2.2.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	25
2.2.3.1 Phenol-Extraktion .....	25

2.2.3.2 Chloroform-Extraktion .....	25
2.2.4 Fällung von Nukleinsäuren .....	26
2.2.5 cDNA Synthese .....	26
2.2.5.1 Enzymatische Hydrolyse von DNA mit DNaseI .....	26
2.2.5.2 Reverse Transkription .....	27
2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	28
2.2.7 Elektrophorese .....	29
2.2.8 Aufreinigung von PCR Amplifikaten .....	30
2.2.9 Klonierung .....	31
2.2.9.1 Herstellung kompetenter Zellen .....	31
2.2.9.2 Ligation und Transformation .....	32
2.2.9.3 Plasmidpräparation .....	33
2.2.10 Sequenzierung .....	34
2.2.11 Auswertung der Sequenzen .....	35
3. Ergebnisse .....	36
3.1 Sequenzanalyse der Plastidengenome von <i>Cuscuta reflexa</i> und <i>Cuscuta gronovii</i> .....	36
3.1.1 Sequenzierung des Plastidengenoms von <i>Cuscuta reflexa</i> .....	36
3.1.2 Sequenzierung des Plastidengenoms von <i>Cuscuta gronovii</i> .....	39
3.2 Vergleichende Analyse der Plastidengenome von <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Cuscuta reflexa</i> , <i>Cuscuta gronovii</i> und <i>Epifagus virginiana</i> .....	40
3.2.1 Struktur der Plastidengenome .....	40
3.2.2 Kodierungskapazität der Plastidengenome .....	44
3.3 Vergleichende Analyse von PEP-Promotoren in <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Cuscuta reflexa</i> und <i>Cuscuta gronovii</i> .....	48
3.4 Posttranskriptionelle Prozessierungen der Transkripte von <i>Cuscuta reflexa</i> und <i>Cuscuta gronovii</i> .....	51
3.4.1 Vorkommen und Spleißen plastidärer Introns in <i>Cuscuta reflexa</i> und <i>Cuscuta gronovii</i> .....	51
3.4.2 Bestimmung der Editotypen von <i>Cuscuta reflexa</i> und <i>Cuscuta gronovii</i> .....	55
4. Diskussion .....	59
4.1 Größe, Struktur und Kodierungspotential der Plastidengenome .....	59

4.2	Transkription der Plastidengenome von <i>Cuscuta reflexa</i> und <i>Cuscuta gronovii</i> .....	67
4.3	Verlust des plastidär kodierten Spleißfaktors MatK in <i>Cuscuta gronovii</i> ? ...	69
4.4	RNA Edierung in Plastiden von parasitischen Pflanzen .....	71
4.5	Auswirkungen der parasitischen Lebensweise auf die Plastidengenome...	74
5.	Zusammenfassung.....	78
6.	Abkürzungen .....	79
7.	Literaturverzeichnis .....	80
8.	Anhang.....	94

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1: Spleißmechanismus von Gruppe I und Gruppe II Introns .....	13
Abb. 1-2: Habitus von <i>Cuscuta reflexa</i> und <i>Cuscuta gronovii</i> .....	18
Abb. 3-1: Schematische Darstellung der einzelnen sequenzierten Bereiche von <i>Cuscuta reflexa</i> .....	37
Abb. 3-2: Genkarte von <i>Cuscuta reflexa</i> und <i>Cuscuta gronovii</i> .....	41
Abb. 3-3: Vergrößerte Darstellung der invertierten Sequenzbereiche in <i>Cuscuta reflexa</i> im Vergleich zu <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Cuscuta gronovii</i> und <i>Epifagus virginiana</i> .....	42
Abb. 3-4: Schematische Darstellung der kodierenden Bereiche in <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Cuscuta reflexa</i> , <i>Cuscuta gronovii</i> und <i>Epifagus virginiana</i> .....	44
Abb. 3-5: Plastidäre Kodonnutzung von <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Cuscuta reflexa</i> , <i>Cuscuta gronovii</i> und <i>Epifagus virginiana</i> im Vergleich .....	47
Abb. 3-6: Vergrößerte Darstellung des Bereichs von H-GUG bis C-GCA der Plastidengenome von <i>Cuscuta reflexa</i> und <i>Cuscuta gronovii</i> zur Veranschaulichung der Reduzierung der Plastidengenome aufgrund der parasitischen Lebensweise. ....	48
Abb. 3-7: Vergleich der Promotorsequenzen von fünf PEP Promotoren in <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Cuscuta reflexa</i> und <i>Cuscuta gronovii</i> .....	50
Abb. 3-8: Nachweis der Introns bzw. Verlust der Introns mittels PCR/RT-PCR ...	53
Abb. 3-9: Spleißen des Intron 2 von <i>clpP</i> in <i>Cuscuta gronovii</i> .....	54
Abb. 3-10: Sequenzausschnitte der Edierungsstellen von <i>Cuscuta reflexa</i> und <i>Cuscuta gronovii</i> .....	56
Abb. 4-1: Auswirkungen der parasitischen Lebensweise auf die Plastiden- genome .....	75



## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 3-1: Klone und PCR-Produkte zur Sequenzierung des Plastidengenoms von <i>Cuscuta reflexa</i> .....	38
Tab. 3-2: PCR-Produkte zur Sequenzierung des Plastidengenoms von <i>Cuscuta gronovii</i> .....	39
Tab. 3-3: Eigenschaften der Plastidengenome von <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Cuscuta reflexa</i> , <i>Cuscuta gronovii</i> und <i>Epifagus virginiana</i> .....	40
Tab. 3-4: Gengehalt der Plastidengenome von <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Cuscuta reflexa</i> , <i>Cuscuta gronovii</i> und <i>Epifagus virginiana</i> .....	45
Tab. 3-5: Übersicht über das Vorkommen von Introns in <i>Cuscuta reflexa</i> , <i>Cuscuta gronovii</i> und <i>Epifagus virginiana</i> .....	52
Tab. 3-6: Edierungstellen in <i>Cuscuta reflexa</i> und <i>Cuscuta gronovii</i> .....	55
Tab. 4-1: Kodonnutzung von Kodons für die die entsprechende tRNA nicht im Plastidengenom kodiert ist.....	66
Tab. 4-2: relevante Edierungsstellen für <i>Cuscuta</i> .....	72

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Die Evolution der Plastide

Plastiden sind ein charakteristisches Organell für photoautotrophe Eukaryotenzellen. Die zentrale Funktion von Plastiden in Pflanzenzellen ist die Photosynthese, die in den Chloroplasten stattfindet. Neben der Energiegewinnung durch die Photosynthese finden in den Chloroplasten zahlreiche Reaktionen des Primär- und Sekundärstoffwechsels statt, wie zum Beispiel die Synthese von Fettsäuren oder Aminosäuren. Plastiden dienen oft auch als Speicherkompartimente, zum Beispiel für Stärke (Amyloplasten) oder auch für Fettsäuren (Elaioplasten).

Bereits 1883 beobachtete Andreas Franz Wilhelm Schimper anhand von morphologischen Ähnlichkeiten, dass Plastiden von frei lebenden Prokaryoten abstammen und nicht *de novo* entstehen können (Schimper, 1883). 1905 formulierte Konstantin Mereschkowsky die Endosymbiontenhypothese, in der Cyanobakterien als mögliche Vorläufer der Chloroplasten beschrieben sind (Mereschkowsky, 1905, 1910). 1970 wurde durch Lynn Margulis die Endosymbiontenhypothese erneut aufgegriffen und ausführlich dargestellt (Margulis, 1970). Es wird heute davon ausgegangen, dass eine eukaryotische Wirtszelle, die bereits einen Vorläufer der Mitochondrien besaß, durch Endozytose einen Vorläufer der heutigen Cyanobakterien aufgenommen hat. Dass es sich tatsächlich um einen cyanobakteriellen Vorläufer handelte, konnte durch vergleichende Sequenzanalysen von Organellen-DNA und der DNA von rezenten Cyanobakterien, ebenso wie durch strukturelle Merkmale bestätigt werden (McFadden, 1999). Aufgrund von phylogenetischen Analysen geht man davon aus, dass alle primären Plastiden monophyletisch (Martin and Herrmann, 1998; Stoebe and Kowallik, 1999; Rodriguez-Ezpeleta *et al.*, 2005) vor ca. 1 bis 1,5 Milliarden Jahren entstanden sind (Douzery *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2004). Der von der eukaryotischen Wirtszelle aufgenommene Vorläufer der rezenten Cyanobakterien wurde nicht metabol-

isiert, sondern es entwickelte sich eine Symbiose. In Folge dieser Endosymbiose kam es zu zahlreichen Reduzierungen des ursprünglichen Genoms des ancestralen Cyanobakteriums. Der Verlust an Genen im Endosymbionten betrifft sowohl redundante Gene von Wirt und Endosymbiont als auch Gene des Endosymbionten die in den Nukleus des Wirtes transferiert wurden (Martin and Herrmann, 1998; Martin *et al.*, 1998). So sind von den ca. 3 000 - 7 000 Genen von frei lebenden rezenten Cyanobakterien (Kaneko *et al.*, 1996) durchschnittlich nur noch 100 - 140 Gene in heutigen Plastidengenomen zu finden. Im Kerngenom von *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) konnten ca. 4 500 Gene identifiziert werden, die cyanobakteriellen Ursprungs sind; dies sind ungefähr 18% des Gesamtgenoms (Martin *et al.*, 2002). Jedoch wird nur ein Teil dieser Proteine in die Organellen zurückimportiert.

Die Frage nach einer weiteren Reduzierung bis hin zum eventuell kompletten Verlust des Plastidengenoms ist Gegenstand zahlreicher Diskussionen. Eine der verschiedenen Hypothesen zu diesem Thema ist, dass das heutige Plastidengenom eine Art Zwischenstufe auf dem Weg zum vollständigen Verlust des Genoms in Chloroplasten ist (Herrmann, 1997). Eine weitere Hypothese ist, dass der Erhalt der Gene für die Hauptkomponenten der Elektronentransportkette im Plastidengenom notwendig ist, um die Redoxbalance in den Chloroplasten aufrecht zu erhalten und somit eine Anhäufung von schädlichen Sauerstoffradikalen zu verhindern. Dies kann durch eine direkte Redoxkontrolle der Transkription durch die Genprodukte der entsprechenden Gene in den Chloroplasten erlangt werden (Allen, 1993, 2003).

### 1.2 Das Plastidengenom

Das Plastidengenom von photosynthetisch aktiven Landpflanzen ist typischerweise zwischen 120 - 160 Kbp groß. In einzelnen Fällen kann das Plastidengenom jedoch deutlich reduziert sein, wie bei dem Wurzelparasiten *E. virginiana* (70 Kbp, Wolfe *et al.*, 1992) oder aber wie bei *Pelargonium x hortum* auch deutlich größer

sein (218 Kbp, Chumley *et al.*, 2006). In höheren Landpflanzen findet man bis zu 100 Kopien des plastidären Chromosoms pro Chloroplast. In Mesophyllzellen liegen daher, geht man von ca. 100 Chloroplasten pro Mesophyllzelle aus, bis zu 10 000 Kopien des Plastidenchromosoms vor. Die Kopien der plastidären Chromosomen sind in Protein-DNA-Komplexen, nukleoid ähnlichen Strukturen, organisiert (Nemoto *et al.*, 1990). Das Plastidengenom wird mit wenigen Ausnahmen durch zwei invertierte repetitive Bereiche IR<sub>A</sub> und IR<sub>B</sub> (IR: *inverted repeat*) in eine große und eine kleine Einzelkopieregion (LSC: *large single copy region*; SSC: *small single copy region*) unterteilt. Die bisher etablierte zirkuläre Darstellung der verschiedenen sequenzierten Plastidengenome muss nach neueren Erkenntnissen überdacht werden, da für *Zea mays* gezeigt werden konnte, dass nur ca. 3 - 4% der plastidären DNA zirkulär vorliegen und der Rest der plastidären DNA linear und mit definierten Enden vorliegt (Oldenburg and Bendich, 2004).

Die bereits sequenzierten Plastidengenome weisen in ihrer Struktur und in ihrem Gengehalt hohe Homologien auf. Die in einem Plastidengenom kodierten Gene (100 - 140) lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen. Eine Gruppe bilden die Gene für den Photosyntheseapparat und die andere Gruppe Gene für den plastidären Genexpressionsapparat (Palmer, 1991; Sugiura, 1995). Bei den identifizierten Genen für den Photosyntheseapparat handelt es sich um Gene für Untereinheiten des Photosystems I („*psa*“) und II („*psb*“), des Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplexes („*pet*“), der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase („*atp*“), des NADPH Dehydrogenasekomplexes („*ndh*“) und die große Untereinheit der Rubisco (*rbcL*), das Schlüsselenzym zur Kohlenstofffixierung im Calvin-Zyklus. Die Funktion des durch die *ndh* Gene kodierten NDH Komplexes konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Es ist wahrscheinlich, dass der NDH Komplex sowohl an der Chlororespiration, als auch am zyklischen Elektronentransport (Burrows *et al.*, 1998) sowie bei der Seneszenz der Blätter (Zapata *et al.*, 2005) beteiligt ist und hauptsächlich unter Stressbedingungen aktiviert wird (Casano *et al.*, 2001).

Für den plastidären Genexpressionsapparat konnten sowohl Gene für Proteine der kleinen („*rps*“) und der großen („*rpl*“) ribosomalen Untereinheiten identifiziert werden, als auch ein vollständiger Satz an rRNAs („*rrn*“) sowie 30 verschiedene tRNAs („*trn*“), welche alle 20 Aminosäuren abdecken (Pfitzinger *et al.*, 1990).

Weiterhin ist typischerweise eine plastidäre RNA Polymerase (*plastid encoded RNA polymerase*: PEP; „*rpo*“; siehe 1.3.1) und ein putativer Spleißfaktor („*matK*“; siehe 1.3.2) im Plastidengenom von Landpflanzen kodiert.

Außerdem sind in den meisten Plastidengenomen von Landpflanzen die Gene *accD* und *clpP* zu finden. *accD* kodiert für die katalytische Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase, einem Enzym des Fettstoffwechsels und *clpP* für die P Untereinheit der ATP- abhängigen *Clp* Protease. Weiterhin ist auf vielen Plastidengenomen von Landpflanzen ein Translationsinitiationsfaktor kodiert („*infA*“). Weiter finden sich in den meisten Plastidengenomen noch einzelne offene Leseraster, deren Funktion bisher noch nicht aufgeklärt werden konnte („*orf*“: *open reading frame*; „*ycf*“: *hypothetical chloroplast reading frame*).

### 1.3 Die plastidäre Genexpression

Die plastidäre Genexpression von Landpflanzen erinnert stark an die Genexpression von Eubakterien. Viele Gene im Plastidengenom sind polycistronisch organisiert. Ein Teil der plastidären Gene wird von der plastidär kodierten RNA Polymerase (PEP) abgelesen, welche vom eubakteriellen Typ ( $\alpha_2\beta\beta'$ ) ist. Weiter finden sich in den Chloroplasten für Prokaryoten typische 70S Ribosomen.

#### 1.3.1 Plastidäre Transkription

Für die plastidäre Transkription von Landpflanzen sind mindestens zwei RNA Polymerasen notwendig. Die plastidär kodierte RNA Polymerase (PEP) vom eubakteriellen Typ und mindestens eine weitere nukleär kodierte Phagentyp RNA Polymerase (*nuclear encoded RNA polymerase*: NEP) (Hess and Börner, 1999).

Die PEP ist im Plastidengenom von Landpflanzen durch vier Gene kodiert.

*rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2*, welche in einem Operon organisiert sind und *rpoA*, das an einem anderen Locus im Plastidengenom kodiert ist. *rpoA* kodiert für die  $\alpha$  Untereinheit und *rpoB* für die  $\beta$  Untereinheit der PEP. Die  $\beta'$  Untereinheit ist in Plastiden durch die Untereinheiten  $\beta'$  und  $\beta''$  zusammengesetzt, die jeweils durch *rpoC1* und *rpoC2* kodiert sind. Die Promotorregionen, welche von der PEP erkannt werden, weisen typische prokaryotische -10 und -35 Sequenzmotive auf. Für eine spezifische Erkennung der PEP-Promotoren sind kernkodierten Sigmafaktoren notwendig. Im Kerngenom von *Arabidopsis thaliana* konnten bereits mehrere solcher Sigmafaktoren identifiziert werden (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), welche in die Plastide importiert werden. Die Transkriptionsinitiation kann erst erfolgen, wenn sich das Holoenzym ( $\alpha_2\beta\beta' \beta''\sigma$ ) gebildet hat (Allison, 2000).

Die NEP besteht nur aus einer einzigen Untereinheit und ist den T3/T7 Bakteriophagen RNA Polymerasen sehr ähnlich (Lerbs-Mache, 1993). Bisher sind im Kerngenom von *Arabidopsis thaliana* drei Gene beschrieben worden, die für RNA Polymerasen kodieren, welche in die Organellen importiert werden. Die RNA Polymerase, welche durch *rpoT1* kodiert ist, wird ausschließlich in die Mitochondrien importiert, die durch *rpoT2* kodierte RNA Polymerase sowohl in die Mitochondrien als auch in die Chloroplasten und die durch *rpoT3* kodierte RNA Polymerase ausschließlich in die Chloroplasten (Hedtke *et al.*, 1997; Hedtke *et al.*, 1999; Hedtke *et al.*, 2000). Das zentrale Erkennungsmotiv (YRTA), welches von der NEP erkannt wird, ist vergleichsweise einfach (Liere and Maliga, 1999).

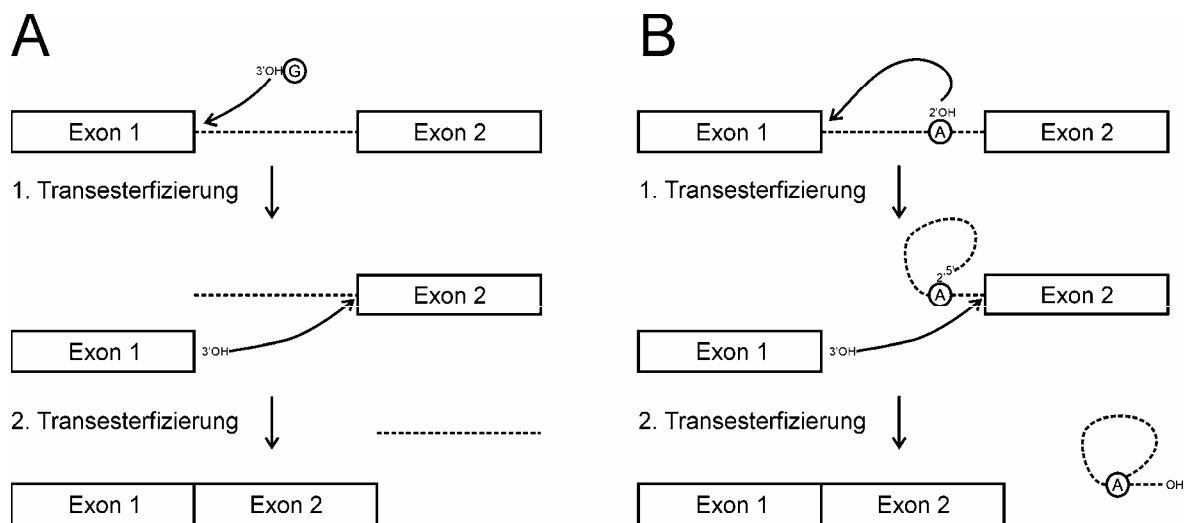
Von der PEP werden vorwiegend Gene des Photosyntheseapparates abgelesen, wohingegen die NEP hauptsächlich für die Transkription von Genen, die für die Genexpression kodieren, zuständig ist. Für manche Gene konnte sowohl die Transkription durch die PEP als auch durch die NEP beschrieben werden. Hieraus ergeben sich drei unterschiedliche Klassen: 1. Gene, welche PEP Promotoren besitzen; 2. Gene mit PEP und NEP Promotoren und 3. Gene mit ausschließlich NEP Promotoren. Von den bisher beschriebenen Promotoren können zehn Gene der 1. Klasse zugeordnet werden: *atpH*, (Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Miyagi *et al.*, 1998), *atpE* (Kapoor *et al.*, 1994), *psaA* (Meng *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1993),

*psbA* (Sugita and Sugiura, 1984), *psbD*, *psbC* (Yao *et al.*, 1989; Shiina *et al.*, 2005), *psbK*, *trnG-UCC* (Meng *et al.*, 1991), *rbcL* (Orozco *et al.*, 1990), und *trnE* (Ohme *et al.*, 1985); fünf Gene konnten der 2. Klasse zugeordnet werden: *atpB* (Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Kapoor *et al.*, 1997), *atpI* (Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Miyagi *et al.*, 1998), *clpP* (Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Sriraman *et al.*, 1998), *rpl32* (Vera *et al.*, 1992; Vera *et al.*, 1996), *rrn16* (Vera and Sugiura, 1995; Allison *et al.*, 1996; Kapoor *et al.*, 1997) und sechs Gene der 3. Klasse: *accD*, *rpoB*, *rps2*, *rps16*, *ycf1*, *ycf2* (Hajdukiewicz *et al.*, 1997).

### 1.3.2 RNA Spleißen in Plastiden

Im Plastidengenom sind einige Gene zu finden, deren Leseraster durch nicht kodierende Bereiche unterbrochen sind, so genannte Introns. Die Introns werden durch einen Spleißprozess entfernt und somit wird das korrekte Leseraster hergestellt. Im Plastidengenom von *N. tabacum* sind 21 Introns in 18 Genen zu finden, die anhand ihrer Sekundärstruktur in zwei Klassen unterteilt werden (Michel *et al.*, 1989). In den verschiedenen Plastidengenomen von Landpflanzen ist typischerweise nur ein Gruppe I Intron zu finden, welches sich im *trnL-UAA* Gen befindet. Gruppe I Introns kommen sonst überwiegend in Prokaryoten vor. Alle anderen Introns, die in einem Plastidengenom zu finden sind, werden der Gruppe II zugeordnet. Die Gruppe II Introns werden anhand ihrer Feinstruktur nochmals in zwei Unterklassen unterteilt, in die Gruppe IIA und die Gruppe IIB (Michel *et al.*, 1989). Gruppe II Introns findet man in Genen von Organellen in Pflanzen, Pilzen, Protisten und in einer Vielzahl von Bakterien (Bonen and Vogel, 2001). In rezenten Cyanobakterien und Proteobakterien, deren Vorläufer als Vorläufer der Chloroplasten und Mitochondrien gelten, konnten ebenfalls Gruppe II Introns nachgewiesen werden (Knoop *et al.*, 1994). Es wird heute aufgrund von strukturellen und mechanistischen Ähnlichkeiten davon ausgegangen, dass die Gruppe II Introns die potentiellen Vorgänger der nukleären Introns sind (Bonen and Vogel, 2001).

Der Spleißvorgang der Gruppe II Introns läuft in zwei Schritten ab (siehe Abb. 1-1B). Die erste Transesterifizierung erfolgt durch einen nukleophilen Angriff einer 2'-OH Gruppe, eines in der Domäne VI des Introns ungepaarten Adenosinrestes, auf die 5' Spleißstelle. Die zweite Transesterifizierung erfolgt durch einen nukleophilen Angriff der nun freien 3'-OH Gruppe des Exons 1 auf die 3' Spleißstelle. Das ausgeschnittene Intron liegt in einem so genannten Lariat vor, welches ein 2'-5' verzweigtes Molekül ist. Der Spleißvorgang von Gruppe I Introns unterscheidet sich in folgenden Punkten von dem Spleißvorgang der Gruppe II Introns (Abb. 1-1A). Die Initiale Transesterifizierung erfolgt bei Gruppe I Introns durch die 3' OH-Gruppe eines externen Guanins. Nach der zweiten Transesterifizierung liegt vorerst ein lineares Intron vor, welches anschließend zirkularisiert (Saldanha *et al.*, 1993; Michel and Ferat, 1995).



**Abb. 1-1: Spleißmechanismus von Gruppe I und Gruppe II Introns**

A: Spleißmechanismus der Gruppe I Introns; B: Spleißmechanismus der Gruppe II Introns; Beschreibung siehe Text; A steht für Adenosinrest; G für Guaninrest

*In vitro* konnte das Spleißen von Gruppe II Introns als autokatalytischer Vorgang beobachtet werden (Saldanha *et al.*, 1993; Rochaix, 1996). *In vivo* hingegen ist der Spleißvorgang abhängig von verschiedenen Spleißfaktoren, von denen die meisten im Kerngenom des Wirtes kodiert sind. In *Zea mays* konnten bisher



3 Proteinkomplexe identifiziert werden, die *in vivo* am Spleißen von Gruppe II Introns beteiligt sind (Jenkins *et al.*, 1997; Jenkins and Barkan, 2001; Till *et al.*, 2001; Ostheimer *et al.*, 2003). Hierbei handelt es sich um die kernkodierte Proteine CRS1, CRS2, CAF1 und CAF2. CRS1 ist notwendig für das Spleißen des *atpF* Introns, drei Introns benötigen einen CRS2/CAF2 Komplex und zwei Introns benötigen sowohl den CRS2/CAF1 als auch den CRS2/CAF2 Komplex (Ostheimer *et al.*, 2003; Asakura and Barkan, 2006). Interessanterweise gehören alle bisher untersuchten Introns, die von einem CRS2 Komplex gespleißt werden der Gruppe IIB an.

Weiterhin gibt es Hinweise, dass neben den nukleären Spleißfaktoren auch plastidär kodierte *trans*-Faktoren am Spleißen beteiligt sind. In ribosomenfreien Mutanten in Mais (*jojap*) und Gerste (*albostrians*) konnten Spleißdefekte in verschiedenen Introns der Gruppe IIA identifiziert werden (Hess *et al.*, 1994; Hübschmann *et al.*, 1996; Jenkins *et al.*, 1997). Daher wird davon ausgegangen, dass ein plastidär kodierte Protein für das Spleißen dieser Gruppe IIA Introns notwendig ist (Hess *et al.*, 1994; Hübschmann *et al.*, 1996; Jenkins *et al.*, 1997; Vogel *et al.*, 1999). Das einzige bisher identifizierte Protein in Plastidengenomen, welches Ähnlichkeiten zu mitochondriellen Maturasen aufweist, die am Spleißen von Gruppe II Introns in Mitochondrien beteiligt sind (Neuhaus and Link, 1987), ist das Genprodukt von *matK*. Der direkte Beweis, dass MatK am Spleißen von Gruppe IIA Introns in Plastiden beteiligt ist, fehlt jedoch bisher.

### 1.3.3 Plastidäre RNA Edierung

Durch RNA Edierung werden Transkripte an definierten Positionen ko- oder posttranskriptionell verändert und es entsteht ein RNA Molekül, welches sich in seiner Sequenz von der genomisch kodierte DNA Sequenz unterscheidet. Ausgenommen sind hierbei spezielle Modifikationen, wie z.B. RNA Spleißen oder Polyadenylierung. Entdeckt wurde RNA Edierung in mitochondrialen Transkripten

von Trypanosomen, wo an spezifischen Stellen Uridine inseriert bzw. deletiert werden (Benne *et al.*, 1986). Inzwischen konnten in zahlreichen Organismen verschiedene RNA Edierungsprozesse beobachtet werden. Die verschiedenen Edierungssysteme modifizieren je nach Organismus und Kompartiment verschiedene RNAs, wie mRNAs, tRNAs oder rRNAs. Die verschiedenen Modifikationen können sowohl Insertionen und Deletionen von einzelnen oder mehreren Nukleotiden (Insertions/Deletions Typ) als auch Modifikation einzelner Nukleotide (Substitutions Typ) sein (ausführliches Review siehe Gott and Emeson, 2000).

In Plastiden höherer Pflanzen findet man ausschließlich C-U Konversionen. In niederen Pflanzen, wie Moosen und Farnen auch U-C. Die einzigen Plastiden, in denen bisher Edierung nicht nachgewiesen werden konnte, sind die des Lebermooses *Marchantia polymorpha* (Freyer *et al.*, 1995). In dem Hornmoos *Anthoceros formosae* konnten hingegen über 1000 Edierungsstellen identifiziert werden (Kugita *et al.*, 2003). In Plastiden höherer Pflanzen sind im Durchschnitt ca. 30 Edierungsstellen zu finden. Die Anzahl und die Verteilung der Edierungsstellen variiert in den Plastidengenomen verschiedener Pflanzenarten. Dieses artspezifische Muster wird Editotyp genannt. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Editotypen nehmen mit zunehmender phylogenetischer Distanz zu. So teilen sich die nah verwandten Arten *N. tabacum* und *Atropa belladonna* 30 Edierungsstellen wohingegen *N. tabacum* und *Pinus thunbergii* nur zwei gemeinsame Edierungsstellen besitzen (Übersicht in Funk *et al.*, 2004). Edierung in Plastiden findet vorwiegend an Stellen statt, an denen durch Edierung das Kodon für eine konservierte Aminosäure hergestellt wird (Maier *et al.*, 1996). Es konnte für einige Edierungsstellen gezeigt werden, dass Edierung an der entsprechenden Stelle von funktioneller Relevanz ist. Durch einen transplastomischen Ansatz konnte in *N. tabacum* gezeigt werden, dass die nicht edierte Form des *psbF* Transkripts zu einem mutanten Phänotyp führt (Bock *et al.*, 1994). Für die Edierungsstelle des *ndhD* Startkodons in *N. tabacum* konnte gezeigt werden, dass nur die edierte Form des Transkripts, mit einem AUG als Startkodon, translatiert werden kann (Hirose and Sugiura, 1997). In *Chlamydomonas reinhardtii* führt die unedierte Form des *petB* Transkripts ebenfalls zu einem mutanten Phänotyp (Zito *et al.*, 1997). Eine unedierte Form des *accD* Transkripts führt in

*vitro* zum Aktivitätsverlust der plastidären Acetyl-CoA-Carboxylase (Sasaki *et al.*, 2001). Für albinotische Cybriden mit einem *Atropa belladonna* Kerngenom und einem *N. tabacum* Plastidengenom konnte gezeigt werden, dass eine für *N. tabacum* spezifische Edierungsstelle im *atpA* Gen in den Cybriden unediert verbleibt und für den albinotischen Phänotyp verantwortlich ist (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005).

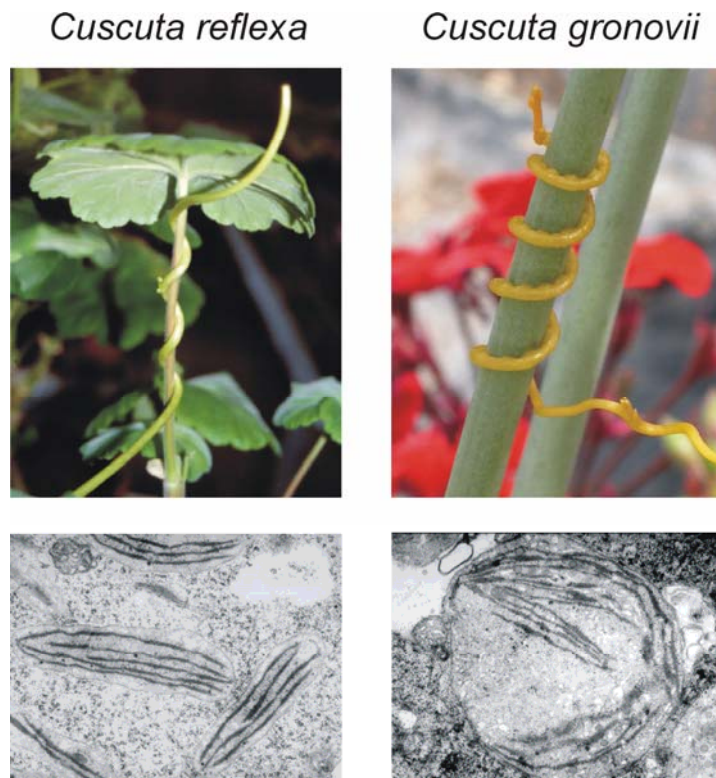
Der Mechanismus der RNA Edierung in Plastiden konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Wahrscheinlich handelt es sich um eine De- oder Transaminierung des C-4 des Cytosins wobei ein Uracil entsteht. Vermittelt wird die Edierung von nukleär kodierten *trans*-Faktoren, die jedoch bisher nicht in vollem Umfang identifiziert werden konnten. So genannte Spezifitätsfaktoren scheinen für die Erkennung einer Edierungsstelle verantwortlich zu sein, indem sie an eine *cis*-site unmittelbar upstream von der Edierungsstelle binden. Diese Spezifitätsfaktoren scheinen entweder nur eine spezifische Edierungsstelle zu erkennen oder bedienen möglicherweise eine kleine Anzahl an Edierungsstellen, die Ähnlichkeiten in ihren *cis*-sites aufweisen (Chateigner-Boutin and Hanson, 2002, 2003; Tillich *et al.*, 2005). Ein solcher bisher identifizierter Faktor ist CRR4 für den gezeigt werden konnte, dass er essentiell für die Edierung einer Stelle im *ndhD* Transkript ist (Kotera *et al.*, 2005; Okuda *et al.*, 2006). Ob die entsprechenden Spezifitätsfaktoren selbst katalytisch aktiv sind oder ob die Faktoren einen Komplex mit einer katalytischen Untereinheit (De-/Transaminase) bilden, konnte bisher nicht geklärt werden (Miyamoto *et al.*, 2004). Dass auch weitere, generelle Faktoren am Edierungsprozess beteiligt sind, konnte mit CP31 gezeigt werden. Dieses RNA bindende Protein ist *in vitro* an der Prozessierung von zwei Edierungsstellen beteiligt (Hirose and Sugiura, 2001).

## 1.4 Parasitische Blütenpflanzen

Parasitische Pflanzen haben ihre autotrophe Lebensweise teilweise bis ganz aufgegeben und parasitieren auf autotrophen Pflanzen, von denen sie Nährstoffe, Wasser und Kohlenhydrate beziehen. Parasitische Pflanzen sind ausschließlich unter den dikotylen Angiospermen zu finden. Es sind bisher ungefähr 4 200 Arten von parasitischen Blütenpflanzen bekannt, was ca. 1% aller Blütenpflanzen ausmacht. Parasitismus scheint unter den Angiospermen Pflanzen mindestens achtmal unabhängig voneinander in verschiedenen Pflanzenfamilien entstanden zu sein (Nickrent, 2002).

In Anpassung an die Lebensweise von Parasiten weisen diese sowohl morphologische und physiologische Veränderungen als auch Veränderungen auf zellulärer Ebene auf. So sind die Blätter der meisten parasitischen Pflanzen deutlich bis vollständig reduziert. Anstatt Wurzeln werden Haustorien ausgebildet, die den Parasiten sowohl eine Nährstoff- als auch eine Wasseraufnahme aus den Wasser- und Nährstoffbahnen des Wirtes ermöglicht. Grundsätzlich werden zwei Arten von Parasitismus unterschieden: Hemi- und Holoparasiten. Die Unterscheidung von Hemi- und Holoparasitismus anhand der Photosyntheseleistung wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich definiert. Einerseits werden Holoparasiten als chlorophylllose, nicht photosynthetisch aktive Pflanzen angesehen (Nickrent *et al.*, 1997; Nickrent, 2002), andererseits können Holoparasiten noch Chlorophyll besitzen, jedoch übersteigt die Photosyntheseleistung nicht den Kompensationspunkt (Hibberd *et al.*, 1998; van der Kooij *et al.*, 2000). Die Pflanzen sind daher in ihrer Nährstoff- und Wasserzufuhr von ihrer Wirtspflanze abhängig und können ohne diese nicht überleben. Hemiparasiten hingegen besitzen Chlorophyll und ihre Photosyntheseleistung ist ausreichend, um einen Teil ihres Lebenszyklus ohne die Wirtspflanze zu überleben. Weiterhin werden Parasiten anhand ihres Ansatzpunktes auf der Wirtspflanze zwischen Sproß- und Wurzelparasiten unterschieden.

Die Gattung *Cuscuta* (Teufelszwirn oder Nesselseide) besteht aus ca. 150 verschiedenen ausschließlich parasitisch lebenden Arten. Alle Arten bestehen aus einem sich windenden Stamm dessen Blätter zu winzigen Schuppen reduziert sind. Sie parasitieren auf dem Stamm- oder Stengelgewebe von autotrophen Angiospermen (Abb. 1-2). Die Wirtsspezifität unterscheidet sich von Art zu Art.



**Abb. 1-2: Habitus von *Cuscuta reflexa* und *Cuscuta gronovii***

Aufnahmen oben: Kirsten Krause; unten: elektronenmikroskopische Aufnahmen der Plastide (I. Dörr).

Manche *Cuscuta* Arten benötigen eine spezifische Wirtspflanze und andere Arten wiederum können auf verschiedenen angiospermen Pflanzen parasitieren. In der Gattung *Cuscuta* sind sowohl Arten zu finden, die noch Chlorophyll besitzen, wie zum Beispiel *C. reflexa* und *C. gronovii* als auch komplett chlorophyllfreie photosynthetisch inaktive Arten wie *C. odorata*. Die chlorophyllhaltigen *Cuscuta* Arten unterscheiden sich teilweise stark in ihrer Photosyntheseleistung, jedoch wird der Kompensationspunkt selbst in der „grünen Art“ *C. reflexa* nicht überschritten (van der Kooij *et al.*, 2000). Die unterschiedliche Photosyntheseleistung spiegelt sich

auch in der Ultrastruktur der Chloroplasten wider. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Chloroplasten von *C. reflexa* sind typische Chloroplasten höherer Landpflanzen mit Stroma- und Granathylakoiden zu erkennen. Bei *C. gronovii* hingegen sind diese Strukturen wesentlich weniger ausgeprägt und bei *C. odorata* fehlen diese komplett (siehe Abb. 1-2, van der Kooij *et al.*, 2000).

Bisher ist ein Plastidengenom einer parasitischen Landpflanze vollständig sequenziert worden, das der Orobanche *Epifagus virginiana* (Wolfe *et al.*, 1992). *E. virginiana* ist ein chlorophyllloser und photosynthetisch inaktiver Wurzelparasit. Das Plastidengenom von *E. virginiana* ist mit 70 Kbp das bisher kleinste sequenzierte Plastidengenom höherer Landpflanzen (Wolfe *et al.*, 1992). Im Plastidengenom von *E. virginiana* sind alle Gene des Photosyntheseapparates deletiert oder nur noch als Pseudogene vorhanden. Neben den Photosynthesegenen sind auch Gene des genetischen Apparates betroffen, wie zum Beispiel die *rpo* Gene für die plastidär kodierte RNA Polymerase (PEP), einige Gene für tRNAs und Gene für ribosomale Proteine (vgl. Tab 3-4, Wolfe *et al.*, 1992). Eine plastidäre Genexpression ist jedoch auch ohne PEP und mit der zunehmenden Deletion von Genen des genetischen Apparates im Plastidengenom von *E. virginiana* möglich (dePamphilis and Palmer, 1990; Ems *et al.*, 1995). Dies deutet darauf hin, dass im Plastidengenom von *E. virginiana* noch essentielle Gene, wie zum Beispiel *ycf1*, *ycf2*, *clpP* und *accD*, exprimiert werden müssen.

Neben dem vollständig sequenzierten Plastidengenom von *E. virginiana* sind in anderen parasitischen Pflanzen, wie *C. reflexa* (Haberhausen *et al.*, 1992; Haberhausen and Zetsche, 1992; Bömmer *et al.*, 1993; Haberhausen and Zetsche, 1994; Berg *et al.*, 2003; Krause *et al.*, 2003; Berg *et al.*, 2004), *C. japonica* (Stefanovic and Olmstead, 2005), *Conopholis americana* (Wimpee *et al.*, 1991; Wimpee *et al.*, 1992; Wimpee *et al.*, 1992) und *Orobanche hederæ* (Thalouarn *et al.*, 1994), Teile bzw. einzelne Gene der Plastidengenome untersucht worden. Weiterhin wurden über verschiedene Hybridisierungsstudien die Plastomgrößen verschiedener *Cuscuta* Arten abgeschätzt (Berg *et al.*, 2003; Revill *et al.*, 2005).

## 1.5 Zielsetzung

Die Gattung *Cuscuta* ist aufgrund der parasitischen Lebensweise und der unterschiedlich stark reduzierten Photosyntheseleistung bis hin zum kompletten Verlust der Photosynthese bei den einzelnen Arten ein optimales Modellsystem, um bei einzelnen Arten einer Gattung die natürlichen Veränderungen im Kodierungspotential des Plastidengenoms zu untersuchen, die mit dem zunehmenden Verlust der Photosyntheseaktivität einhergehen. In dieser Arbeit sollten die Plastidengenome von zwei verschiedenen *Cuscuta* Arten, die aufgrund ihrer parasitischen Lebensweise eine unterschiedlich stark reduzierte Photosyntheseleistung aufweisen, vollständig sequenziert werden. Zum einen sollte die Sequenzierung des Plastidengenoms der „grünen Art“ *C. reflexa*, die bereits in der Doktorarbeit von Sabine Berg begonnen wurde (Berg, 2003), in dieser Arbeit fertig gestellt werden und zum anderen das Plastidengenom von *C. gronovii* als „intermediäre Art“ vollständig sequenziert werden.

Die beiden erhaltenen Plastidengenome von *Cuscuta* sollten mit den bereits vollständig sequenzierten Plastidengenomen einer photosynthetisch aktiven Landpflanze - *Nicotiana tabacum* - und der parasitischen und photosynthetisch inaktiven Blütenpflanze - *E. virginiana* - hinsichtlich ihrer Struktur, ihrer Kodierungskapazität und der Maschinerie für die plastidäre Genexpression verglichen werden. Die verschiedenen in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollten Aufschluss geben über den Verlauf des sukzessiven Verlustes der Photosyntheseaktivität und die resultierenden Konsequenzen für die Plastidengenome solcher Pflanzen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial

Die parasitischen Pflanzen *C. reflexa* und *C. gronovii* wurden von dem Botanischen Garten der Universität Kiel zur Verfügung gestellt. In Marburg wurden die beiden *Cuscuta* Arten auf der Wirtspflanze *Pelargonium zonale* im Gewächshaus weiter kultiviert. Der Licht/Dunkel Rhythmus im Gewächshaus betrug 16/8 Stunden bei 24°C.

#### 2.1.2 Molekularbiologische Kits

Kit	Hersteller
DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen (Hilden)
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	GE-Healthcare (Freiburg)
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE-Healthcare (Freiburg)
Long PCR Enzyme Mix	Fermentas (St. Leon-Rot)
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen (Hilden)
PCR clean-up Gel extraction Nucleospin Extract II	Machery-Nagel (Düren)

#### 2.1.3 Enzyme

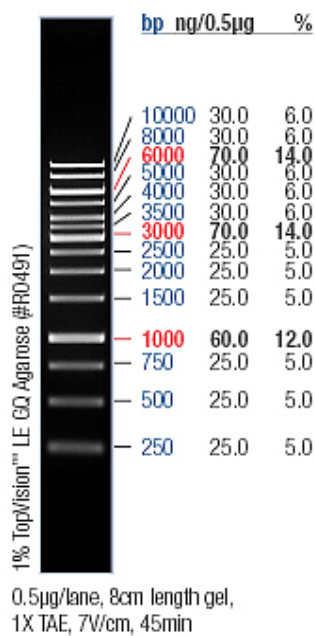
Enzyme	Hersteller
DNase I RNase free	Roche (Mannheim)
Omniscript Reverse Transcription	Qiagen (Hilden)
pGem-T Easy Vector	Promega (Mannheim)
Restriktionsenzyme und Puffer	Fermentas und New England Biolabs (St. Leon-Rot und Frankfurt a. M.)
RNase A	Qiagen (Hilden)
T4 DNA Ligase	Roche (Mannheim)
Taq-DNA Polymerase	Qiagen und Fermentas (Hilden und St. Leon-Rot)



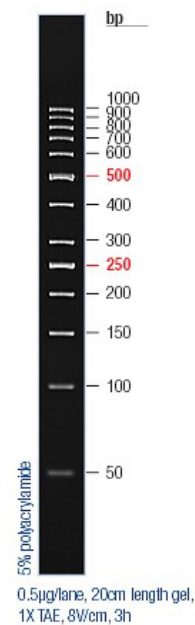
### 2.1.4 DNA-Marker

Als Längenstandards für Nukleinsäuren wurde für Fragmente ab einer Größe von 240 Bp die 1 Kbp DNA Ladder und für kleinere Fragmente die 50 Bp DNA Ladder von Fermentas (St. Leon-Roth) verwendet.

1 Kbp DNA Ladder:



50 Bp DNA Ladder:



### 2.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
ABI 377 Sequenzierautomat	Applied Biosystems (Darmstadt)
Biometra T Gradient PCR-Automat	Biometra (Göttingen)
GeneQuant II	GE Healthcare (Freiburg)
Zentrifuge Eppendorf: 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Hettrich: Mikro22R	Hettrich (Tuttlingen)

### **2.1.6 Software**

Software	Hersteller
Bioedit	Ibis Therapeutics (Carlsbad, CA, USA)
Chromas	Technelysium Pty Ltd (Tewantin, Qld, AU)
Sequencher 4.7	Gene Codes Corporation (Ann Arbor, MI, USA)

### **2.1.7 Chemikalien und Verbrauchsmittel**

Soweit im Text nicht anders vermerkt wurden alle Chemikalien und Verbrauchsmittel entweder von Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), Merck Biosciences (Darmstadt) oder Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Extraktion von DNA**

Die DNA Isolation erfolgte nach einem modifiziertem Protokoll von Doyle und Doyle (Doyle and Doyle, 1990). Zur Isolation von DNA wurden ca. 100 mg Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff im Mörser zerkleinert und mit 600 µl CTAB-Extraktionspuffer versetzt. Die Suspension wurde nach kräftigem Mischen bei 60°C für eine Stunde inkubiert und anschließend durch zwei Chloroform-extraktionsschritte (siehe 2.2.3.2) gereinigt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 30 000 x g für 20 Minuten bei 4°C, um eventuell noch enthaltene unlösliche Bestandteile zu entfernen. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol und einem Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 20 000 x g und 4°C. Die sedimentierten Nukleinsäuren wurden mit 70% Ethanol

gewaschen und das getrocknete Pellet in 20 – 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> resuspendiert. Optional wurde die mitisolierte RNA durch Zugabe von 1 µl RNase A (10 µg/ml) und Inkubation für 30 Minuten bei 37°C entfernt.

<u>CTAB-Extraktionspuffer:</u>	2 %	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB)
	1,4 M	NaCl
	100 mM	Tris/HCl pH 8,0
	20 mM	EDTA
	100 mM	β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)

Optional zu der DNA Isolation nach Doyle (Doyle and Doyle, 1990) wurde DNA mit dem DNeasy Plant Mini Kit von Qiagen entsprechend der Angaben des Herstellers gewonnen.

### 2.2.2 Extraktion von RNA

Zur Isolation von RNA aus *Cuscuta* wurde die eigentlich für die DNA optimierte CTAB-Methode angewendet (siehe 2.2.1). Hierfür wurden alle entsprechenden Reagenzien durch Sterilfiltration mit Spitzenvorsatzfiltern mit einer Porengröße von 0,22 µm (Roth, Karlsruhe) RNase-frei gemacht und RNase-freie Gefäße verwendet. Die durch die CTAB-Methode gewonnen Nukleinsäuren (DNA und RNA) wurden mit DNase I behandelt (siehe 2.2.5.1) und somit reine RNA gewonnen.

Die Quantität der isolierten Nukleinsäuren wurde durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm im Spektralphotometer GeneQuant II (GE Healthcare, Freiburg) nach der Formel  $A_{260} \times \text{Faktor} = \mu\text{g/ml}$  bestimmt. Die entsprechenden Faktoren sind für RNA 40 und für dsDNA 50.

### 2.2.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren

#### 2.2.3.1 *Phenol-Extraktion*

Zur Entfernung von Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis: 24 Teile Phenol, 24 Teile Chloroform und ein Teil Isoamylalkohol) zugegeben und für 30 Sekunden kräftig geschüttelt. Anschließend erfolgte durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 10 000 x g bei 10°C eine Phasentrennung. Die obere wässrige Phase, die die Nukleinsäuren enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Phenol-Extraktion wiederholt. Anschließend folgte ein Chloroform-Extraktionsschritt (2.2.3.2), um die gelösten Nukleinsäuren von Phenolrückständen zu reinigen.

#### 2.2.3.2 *Chloroform-Extraktion*

Die Chloroform-Extraktion wurde nach zweimaliger Phenol Extraktion bzw. bei der Isolation von Nukleinsäuren angewendet. Es wurde ein Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24 Teile Chloroform und ein Teil Isoamylalkohol) zugegeben und für 30 Sekunden kräftig geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 10 000 x g und 10°C. Die obere wässrige Phase wurde bei Bedarf nochmals einer Chloroform Extraktion unterzogen oder die Nukleinsäuren direkt gefällt (siehe 2.2.4).

### 2.2.4 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Anreicherung von Nukleinsäuren wurde eine Natriumacetat-Fällung verwendet. Hierzu wurde zu einer Nukleinsäuren enthaltenen Lösung das 0,1fache Volumen 3 M Natriumacetat und das 2,5fache Volumen 100% Ethanol zugegeben. Nach einem kurzen Inkubationsschritt auf Eis wurden die Nukleinsäuren bei 4°C und 20 000 x g für 30 Minuten abzentrifugiert. Das Nukleinsäurepellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, nochmals für 10 Minuten zentrifugiert und das getrocknete Pellet in H<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.2.5 cDNA Synthese

#### 2.2.5.1 Enzymatische Hydrolyse von DNA mit DNase I

Zur Gewinnung von RNA aus *Cuscuta* wurde das CTAB-Protokoll verwendet, womit ein Nukleinsäuregemisch aus DNA und RNA isoliert wird. Für die cDNA Synthese ist es essentiell, dass die RNA keine DNA mehr enthält. Hierfür wurden 10 µg der isolierten Nukleinsäuren einer DNase I Behandlung unterzogen. Diese wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf ein Volumen von 175 µl gebracht, 20 µl 10 x DNase I Puffer und 40 Einheiten DNase I (Roche, Mannheim) zugegeben. Die Reaktion erfolgte bei 37°C für eine Stunde. Zur Entfernung der DNase I wurde der gesamte Ansatz zweimal einer Phenol- und einmal einer Chloroformextraktion (siehe 2.2.3) unterzogen. Anschließend wurde die RNA mittels einer Natriumacetat-Ethanol-Fällung (siehe 2.2.4) gefällt und in 16 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> wieder gelöst.

<u>10 x DNase I Puffer:</u>	400 mM	Tris/HCl pH 7,5
	100 mM	MgCl <sub>2</sub>

### 2.2.5.2 Reverse Transkription

Für die cDNA Synthese wurden 14 µl der DNase I behandelten RNA (siehe 2.2.5.1) zusammen mit Zufallshexaoligonukleotiden (10 pmol) bei 60°C für fünf Minuten denaturiert. Anschließend wurden auf Eis 4 µl 10 x RT-Puffer, 4 µl Desoxynukleotidmix (5mM) und 2 µl Reverse Transkriptase (4U/µl) zugegeben und auf ein Volumen von 40 µl gebracht. Die Erststrangsynthese erfolgte bei 37°C für eine Stunde. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 93°C denaturiert.

<u>Reaktionsansatz (40 µl):</u>	14 µl	RNA DNase I behandelt
	1 µl	Zufallshexaoligonukleotide (10 pmol)
	4 µl	10 x Puffer
	4 µl	dNTPs (5mM)
	2 µl	Reverse Transkriptase "Omniscript" (4U/µl)
	ad 40 µl H <sub>2</sub> O	

Alternativ zur Herstellung von Gesamt-cDNA mit Zufallshexaoligonukleotiden als Primer, wurde das OneStep RT-PCR Kit von Qiagen verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Enzymmix, der sowohl eine Reverse Transkriptase als auch eine *Taq*-Polymerase enthält. Es wurde zuerst mit spezifischen Primern der entsprechende cDNA Strang synthetisiert und anschließend nach einer Denaturierung, welche ebenfalls die *Taq*-Polymerase aktiviert, die synthetisierte cDNA mittels PCR amplifiziert. Pro Reaktionsansatz wurde jeweils 1 µl der DNase I behandelten RNA (siehe 2.2.5.1) eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten nach der entsprechenden Anleitung des Herstellers.

### 2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation spezifischer DNA und cDNA Bereiche mit einer Länge von bis zu 2 Kbp wurde die *Taq*-DNA Polymerase von Fermentas bzw. Qiagen verwendet.

<u>Reaktionsansatz (50 µl):</u>	5 µl	10 x <i>Taq</i> -Puffer
	5 µl	dNTPs (2 mM)
	5 µl	MgCl <sub>2</sub>
	1 µl	Primer 1 (10 pmol/µl)
	1 µl	Primer 2 (10 pmol/µl)
		~ 50 ng DNA/cDNA
	0,25 µl	<i>Taq</i> -DNA Polymerase (5U/µl)
		ad 50 µl H <sub>2</sub> O

Die PCR Reaktion wurde im PCR Automaten mit folgendem Programm durchgeführt: Ein initialer Denaturierungsschritt bei 95°C für 5 Minuten; darauf folgend ca. 30 Zyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 30 Sekunden; Primerannealing bei 48-55°C (je nach Schmelztemperatur der Primer) für 30 Sekunden und ein Elongationsschritt bei 72°C für eine Minute pro Kbp des zu amplifizierenden Produktes; abgeschlossen wurde die Reaktion mit einem finalen Elongationsschritt für 5 Minuten bei 72°C.

Zur Amplifikation von DNA Bereichen, die größer als 2 Kbp sind, wurde das „Long PCR Enzyme Mix“ von Fermentas verwendet.

<u>Reaktionsansatz (50 <math>\mu</math>l):</u>	5 $\mu$ l	10 x <i>Taq</i> -Puffer
	5 $\mu$ l	dNTPs (2 mM)
	1 $\mu$ l	Primer 1 (10 pmol/ $\mu$ l)
	1 $\mu$ l	Primer 2 (10 pmol/ $\mu$ l)
	~50 ng	DNA
	0,5 $\mu$ l	<i>Taq</i> -DNA Polymerase (5U/ $\mu$ l)
	ad 50 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	

Die PCR Reaktion wurde nach Empfehlung des Herstellers folgendermaßen angepasst: Ein initialer Denaturierungsschritt bei 95°C für 2 Minuten; darauf folgend 10 Zyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 20 Sekunden; Primerannealing bei 48-55°C (je nach Schmelztemperatur der Primer) für 30 Sekunden und ein Elongationsschritt bei 68°C für eine Minute pro Kbp des zu amplifizierenden Produktes; darauf folgten weitere 25 Zyklen nach dem obigen Schema mit einer Verlängerung der Elongationszeit um 10 Sekunden pro Zyklus; abgeschlossen wurde die Reaktion mit einem finalen Elongationsschritt für 10 Minuten bei 68°C.

### 2.2.7 Elektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte oder der isolierten DNA wurden diese elektrophoretisch auf einem 0,8 - 2%igem Agarosegel, je nach Größe der zu erwartenden Fragmente, aufgetrennt. Für genomische DNA und PCR-Fragmente größer als 5 Kbp wurde ein 0,8%iges TAE Gel mit 1 x TAE Laufpuffer verwendet. Für alle anderen Agarosegele wurde TBE Puffer verwendet. Die Agarosegele wurden mit 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid versetzt, das in Nukleinsäuren interkaliert und unter UV Licht fluoresziert.

Für sehr kleine PCR-Produkte (z.B. Amplifikation der tRNAs ca. 100 Bp) wurde ein Polyacrylamid Gel (PAA) verwendet.



<u>Gelansatz:</u>	2,1 ml	H <sub>2</sub> O
	6,75 ml	PAA (30%)
	3 ml	4 x TBE
	200 µl	APS (10%)
	12 µl	TEMED

Die Auftrennung erfolgte für drei bis vier Stunden bei 15 – 20 mA. Anschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Färbelösung (5 µg/ml) gefärbt und unter UV Licht photographiert.

<u>10 x TBE:</u>	0,89 M	Tris
	0,89 M	Borsäure
	20 mM	EDTA

<u>50 x TAE (pH 7,4-7,6):</u>	2 M	Tris/HCl
	1 M	Natriumacetat
	20 mM	EDTA

<u>10 x Auftragspuffer:</u>	4 M	Harnstoff
	50 % (w/v)	Saccharose
	50 mM	EDTA
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,1 % (w/v)	Xylencyanol

### 2.2.8 Aufreinigung von PCR Amplifikaten

PCR Amplifikate, welche direkt sequenziert wurden, wurden mit dem „Nucleo-Spin Extract II Kit“ nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Zur Elution einzelner PCR-Banden aus Agarosegelen und zur Aufreinigung von PCR-

Amplifikaten, welche zur Klonierung vorgesehen waren wurde das „GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ nach den Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.2.9 Klonierung

#### 2.2.9.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung chemokompetenter *Escherichia coli* Zellen (DH5 $\alpha$ : gyrA96 recA1 endA1 relA1 thi-1 hsdR17 supE44 deoR  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169  $\Phi$ 80  $\Delta$ lacZ  $\Delta$ M15) erfolgte mittels RbCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub>. Hierzu wurden 100 ml LB Medium mit jeweils 10 mM MgCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> mit 2 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen. Alle darauf folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis und im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden in Zentrifugenbecher überführt und auf Eis 30 Minuten inkubiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt für 8 Minuten bei 3000 x g. Der Überstand wurde komplett entfernt und die Zellen in 33 ml RF1 resuspendiert und wiederum 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nochmals bei 3000 x g 8 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 5 ml RF2 resuspendiert und auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die kompetenten Zellen in 100  $\mu$ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

<u>RF1:</u>	100 mM RbCl <sub>2</sub>
	50 mM MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O
	30 mM Kaliumacetat (1 M KAc Stocklösung verdünnt)
	15% (w/v) Glycerol
	pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt

RF2:                    10 mM    MOPS (von 0,5 M MOPS Stocklösung verdünnt)  
                              10 mM    RbCl<sub>2</sub>  
                              75 mM    CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
                              15 % (w/v) Glycerol  
                              pH 5,8 mit NaOH eingestellt

LB-Medium (1 Liter):    10 g    Pepton aus Casein, tryptisch verdaut  
                                      5 g    Hefeextrakt  
                                      10 g    NaCl  
                                      ad 1 Liter H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>  
                                      pH 7,0 mit 5 N NaOH eingestellt  
                                      16 Minuten bei 116°C autoklavieren

### **2.2.9.2 Ligation und Transformation**

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde der TA-Vektor pGemT von Promega verwendet. Die Ligation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Für die Transformation wurde der gesamte Ligationsansatz zu 100 µl chemokompetenten Zellen (siehe 2.2.9.1) gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für eine Minute bei 42°C. Zur Regeneration der Zellen wurde 300 µl LB-Medium zugegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen auf LB-Amp Agarplatten (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die einzelnen Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR überprüft. Hierzu wurde die entsprechende Kolonie in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> suspendiert, dies und der initiale Denaturierungsschritt der PCR waren ausreichend, um das jeweilige gewünschte Fragment zu amplifizieren. Positiv getestete Kolonien konnten direkt aus der Suspension in eine LB-Amp Übernachtskultur angeimpft werden.

### 2.2.9.3 Plasmidpräparation

Das Protokoll für die Plasmidpräparation folgte nach dem bei Birnboim und Doly (1979) beschriebenen Grundprotokoll, das von Ausubel (1987) modifiziert wurde (Birnboim and Doly, 1979; Ausubel *et al.*, 1987). Hierfür wurden 1,5 ml der Übernachtskultur der Transformatierten Zellen bei 20 000 x g abzentrifugiert und das Pellet in 150 µl Lösung 1 resuspendiert und 200 µl Lösung 2 zugegeben gut gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung 3 und 25 µl Chloroform zugegeben und kräftig geschüttelt und auf Eis für 5 Minuten inkubiert. Es folgte nach nochmaligem kräftigem schütteln ein Zentrifugationsschritt bei 20 000 x g für 5 Minuten. Die im wässrigen Überstand enthaltene Plasmid DNA wurde durch Zugabe von 350 µl Isopropanol und Zentrifugation für 30 Minuten bei 20 000 x g und 4°C gefällt. Das erhaltene Pellet wurde nochmals mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen. Die mitisolierte RNA wurde durch RNase A hydrolisiert.

<u>Lösung 1:</u>	50 mM	Glucose
	10 mM	EDTA pH 8,0
	25 mM	Tris/HCl pH 8,0

<u>Lösung 2:</u>	0,2 N	NaOH
	1%	SDS

<u>Lösung 3:</u>	3 M	Kaliumacetat pH 4,8
------------------	-----	---------------------

### 2.2.10 Sequenzierung

Alle Sequenzen wurden ausschließlich mit dem Sequenzierautomat „ABI PRISM 377 DNA Sequencer“ (Applied Biosystems, Darmstadt) sequenziert. Die hier angewendete Technik beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1992). Die zu sequenzierenden PCR-Produkte wurden nach den unter 2.2.8 beschriebenen Methoden aufgereinigt. Zur Sequenzierung von PCR-Produkten wurden 10 ng pro Kbp PCR-Produkt und zur Sequenzierung von Plasmiden 0,5 - 1 µg DNA eingesetzt. Die Sequenzreaktion erfolgte nach Zugabe von 0,5 pmol des entsprechenden Primers und 2 µl „Sequenziermix“ („DYEnamic ET terminator Cycle Sequencing Kit“; GE Healthcare, Freiburg) in einem Reaktionsvolumen von 10 µl. Die lineare Sequenzierreaktion erfolgte durch folgende Zyklen im PCR Automat: 1. Zyklus 2 Minuten Denaturierung bei 95°C; Zyklen: 2-26 jeweils 10 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 10 Sekunden Annealing bei 48-55°C (je nach Schmelztemperatur der Primer) und 4 Minuten Synthese bei 72°C.

Im Anschluss wurden die Produkte durch Zugabe von 26 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> und 64 µl 100% Ethanol gefällt, um freie Terminatoren zu entfernen. Der Ansatz wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 20 000 x g und 4°C zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol wurde das getrocknete Pellet in 3 µl „Formamide Loading Dye“ (GE Healthcare, Freiburg) resuspendiert.

Die Auftrennung der Sequenzierprodukte erfolgte in einem 48 cm langen, 0,2 mm dicken und 6,3%igen denaturierenden Polyacrylamidgel im Sequenzierautomaten für 11 Stunden.

<u>Sequenzgel (6,3%):</u>	18 g	Harnstoff
	22,8 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
	5,33 ml	Accugel 40% (29:1)
	6 ml	10 x TBE (siehe 2.2.6)
nach dem Filtrieren und Entgasen der Gellösung Zugabe von:		
	300 µl	APS (10%)
	20 µl	TEMED

### 2.2.11 Auswertung der Sequenzen

Für die Auswertung und das Zusammensetzen der Sequenzen wurde das Programm Sequencher 4.7 verwendet. Die Annotation der Plastidengenome wurde mit dem von NCBI zur Verfügung gestellten Programm Sequin durchgeführt. Für die Identifikation aller auf den Plastidengenomen kodierten Leseraster wurde sowohl der ORF Finder von NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), das BLAST Tool von NCBI als auch der tRNAscan (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE>) verwendet.

### 3. ERGEBNISSE

Um die Anpassung an den Parasitismus detaillierter darstellen zu können, wird im Folgenden zu den beiden in dieser Arbeit sequenzierten Plastidengenomen von *Cuscuta*, die Plastidengenomsequenz der photosynthetisch aktiven und nicht parasitisch lebenden Landpflanze *Nicotiana tabacum* (Shinozaki *et al.*, 1986) und die Plastidengenomsequenz der chlorophyllfreien parasitischen Landpflanze *Epifagus virginiana* hinzugezogen (Wolfe *et al.*, 1992). Somit stehen Sequenzen von Plastidengenomen mit unterschiedlich stark angepasster Lebensweise an den Parasitismus zur Verfügung. *N. tabacum* als Vertreter der nicht parasitischen und photosynthetisch aktiven Blütenpflanzen, die Parasiten *C. reflexa* mit reduzierter Photosyntheseleistung, als „grüne Art“, *C. gronovii* mit stark eingeschränkter Photosynthese und deformierten Chloroplasten, als „intermediäre Art“, und *E. virginiana*, die kein Chlorophyll mehr besitzt, als „weiße Art“.

#### 3.1 Sequenzanalyse der Plastidengenome von *Cuscuta reflexa* und *Cuscuta gronovii*

##### 3.1.1 Sequenzierung des Plastidengenoms von *Cuscuta reflexa*

Grundlage für die Sequenzierung des Plastidengenoms von *C. reflexa* waren drei Sequenzbereiche (x67512, x61698 und x72584), welche in der EMBL Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/genomes/organelle.html>) zur Verfügung stehen sowie Sequenzen aus der Doktorarbeit von Sabine Berg (siehe Abb. 3-1 und Tab. 3-1, Berg, 2003). Ebenfalls wurde in dieser Arbeit ein von Sabine Berg hergestellter aber noch nicht sequenzierter Klon (B2) sequenziert. Die noch vorhandenen Lücken zwischen den bereits bekannten Sequenzen wurden in dieser Arbeit

mittels eines „long PCR“ Ansatzes geschlossen (Tab. 3-1; siehe 2.2.6). Alle in dieser Arbeit neu sequenzierten Bereiche wurden mit mindestens zwei Sequenzen von unabhängigen PCR Produkten verifiziert. Alle bereits vorhandenen Sequenzdaten wurden ebenfalls mittels eines „long PCR“ Ansatzes durch Sequenzierung von mehreren PCR-Produkten (PCR 8-19 siehe Tab. 3-1 und 2.2.6+10) überprüft. Die annotierte Sequenz des Plastidengenoms von *C. reflexa* umfasst 121 521 Bp und ist in der EMBL Datenbank unter der Akzessionsnummer AM711640 hinterlegt.



**Abb. 3-1: Schematische Darstellung der einzelnen sequenzierten Bereiche von *Cuscuta reflexa***

Innerer Kreis: schematisches Plastidengenom von *C. reflexa* mit IR<sub>A</sub> und IR<sub>B</sub> (*inverted repeat* A und B); zweiter Kreis von innen: Sequenzbereiche, die in der EMBL Datenbank zur Verfügung stehen mit entsprechender Akzessionsnummer (grau); dritter Kreis von innen: Sequenzbereiche, die von Sabine Berg sequenziert wurden (gelb); äußerer Kreis: Sequenzbereiche, die in dieser Arbeit sequenziert wurden (grün).



**Tab. 3-1: Klone und PCR-Produkte zur Sequenzierung des Plastidengenoms von *Cuscuta reflexa***

Klon/PCR-Akzessionsnr.	Länge	Position	Primer 1	Primer 2
x67512	5317 bp	117915-1745		
PS1	5612 bp	937-6548		
trnG-atpH	4586 bp	5918-10503		
B2	7798 bp	9855-17652	BamHI Klon Doktorarbeit Sabine Berg (Berg, 2003)	
PCR5	3530 bp	17484-21014	PrpoBfor	rpoC1revCus
rpoBC1	3286 bp	20034-23319		
PCR2	3638 bp	22117-25755	AT7rpoB	Aycf6
B1	3951 bp	25585-29535		
PCR7	6501 bp	28800-35300	psaACus3	ApsbC
PCR6	5259 bp	35260-40518	Arps4	psaACus2
trnV-rps4	1733 bp	40018-41752		
PCR3	8926 bp	41715-50640	rbcLoutCus	trnLforCus
x61698	6084 bp	50530-56614		
PS4	4314 bp	54059-58372		
PCR4	5064 bp	58238-63301	AT7psbB	Arps18
psbB-rpl22	11212 bp	62630-73847		
rplIR	6421 bp	73388-79808	ycf2revCus	rpl22forCus
x67512 (IR)	3540 bp	79469-83008		
x72584	8807 bp	83003-91816		
PCR1	3309 bp	91578-94887	Srrn4.5rev	trnACus
H1	1275 bp	94023-95297		
SSC	10396 bp	94903-105299	Arrn5	Arrn5
H1	1275 bp	105601-106935		
PCR1	3309 bp	106071-109380	Srrn4.5rev	trnACus
x72584	8807 bp	109142-117955		
x67512	3540 bp	117950-121489		
rplIR (IR)	372 bp	121150-121521	ycf2revCus	rpl22forCus
PCR18	1903 bp	117965-1903	K6	AtrnL-caa
PCR17	4531 bp	1831-6361	K7	trnGuccfor
PCR16	4783 bp	6144-10926	Arps2	trnGuccfor
PCR15	1363 bp	20961-22323	rpoBCusrev	rpoBCusfor
PCR14	3188 bp	25639-28826	psbCCus4	ycf6Cus2
PCR12	1713 bp	40465-42177	rps4revCus	AT7trnLuaa
PCR11	4572 bp	50294-54865	AT7atpE	accDCus2
PCR10	3841 bp	54644-58404	rps18Cus3	AatpE
PCR8	5475 bp	62838-68312	ApsbB	AT7petD
PCR9	5626 bp	68230-73855	SrpoA	Arpl22
PCR19	9091 bp	82688-91778	AT7trnL-caa	AT7trnA-ugc
PCR13	2297 bp	94934-97230	Arrn4.5	Aycf5

IR: IR Bereich (*inverted repeat*); Primersequenzen siehe Anhang; Das PCR Produkt SSC überspannt die gesamte kleine Einzelkopieregion (SSC) und wurde mit nur einem Primer (Arrn5), der im IR Bereich liegt, amplifiziert; die PCR Produkte, die zur Überprüfung der bereits sequenzierten Bereiche amplifiziert wurden sind grau hinterlegt.

### 3.1.2 Sequenzierung des Plastidengenoms von *Cuscuta gronovii*

Für die Sequenzierung des Plastidengenoms von *C. gronovii* wurde ausschließlich ein „long PCR“ Ansatz (siehe 2.2.6) mit überlappenden PCR-Produkten gewählt. Die Primer für den PCR Ansatz wurden von *N. tabacum* (Akzessionsnr.: z00044) und *C. reflexa* abgeleitet. Alle PCRs und die entsprechenden Primer sind in Tabelle 3-2 aufgelistet. Alle Sequenzen wurden mit mindestens zwei unabhängigen PCR-Produkten verifiziert.

Mit einer Größe von 86 744 Bp liegt das Plastidengenom im vorhergesagten Bereich (Berg *et al.*, 2003). Die annotierte Sequenz des Plastidengenoms von *C. gronovii* ist in der EMBL Datenbank unter der Akzessionsnummer AM711639 hinterlegt.

**Tab. 3-2: PCR-Produkte zur Sequenzierung des Plastidengenoms von *Cuscuta gronovii***

PCR	Länge	Position	Primer 1	Primer 2
g15	8862 bp	78077-194	rrn16revCus	psbAforCus
g16	2950 bp	32-2981	StrnH-gug	ST7trnS-gcu
g10	4761 bp	2884-7644	trnSCus	rps2forP
g11	3144 bp	7596-10739	rps2Cus	trnTguurevX2
g12	11370 bp	10213-21582	AT7trnY-gua	Arps4
g13	2791 bp	21065-32523	AT7rps4	atpBforCus
D1	2108 bp	31684-33792	trnFCus	atpBCusfor
g1	9310 bp	24378-33687	AT7atpB	psbE.AT.for
g2	1970 bp	33389-35358	psbF.AT.rev	rpl33Cus
g29	1272 bp	35032-36303	psaJCus	rpl20forodo
g3	8565 bp	35743-44307	rps18forCusg	AT7petD
g5	2129 bp	43617-45745	petDintCus	Arps11
grplIR	6108 bp	45432-51539	AT7rps11	ycf2forgron
g15	8668 bp	50974-59641	rrn16revCus	psbAforCus
g14	1941 bp	59560-61500	Arrn16	AT7rrn23
g17	3862 bp	61469-65330	rrn23Cusfor1	Aycf5
gSSC	11492 bp	64776-76267	Arrn5	Arrn5
g14	1941 bp	76218-78158	Arrn16	AT7rrn23

IR: IR Bereich (*inverted repeat*); Primersequenzen siehe Anhang. Das PCR Produkt SSC überspannt die gesamte kleine Einzelkopieregion (SSC) und wurde mit nur einem Primer (Arrn5), der im IR Bereich liegt, amplifiziert.

## 3.2 Vergleichende Analyse der Plastidengenome von *Nicotiana tabacum*, *Cuscuta reflexa*, *Cuscuta gronovii* und *Epifagus virginiana*

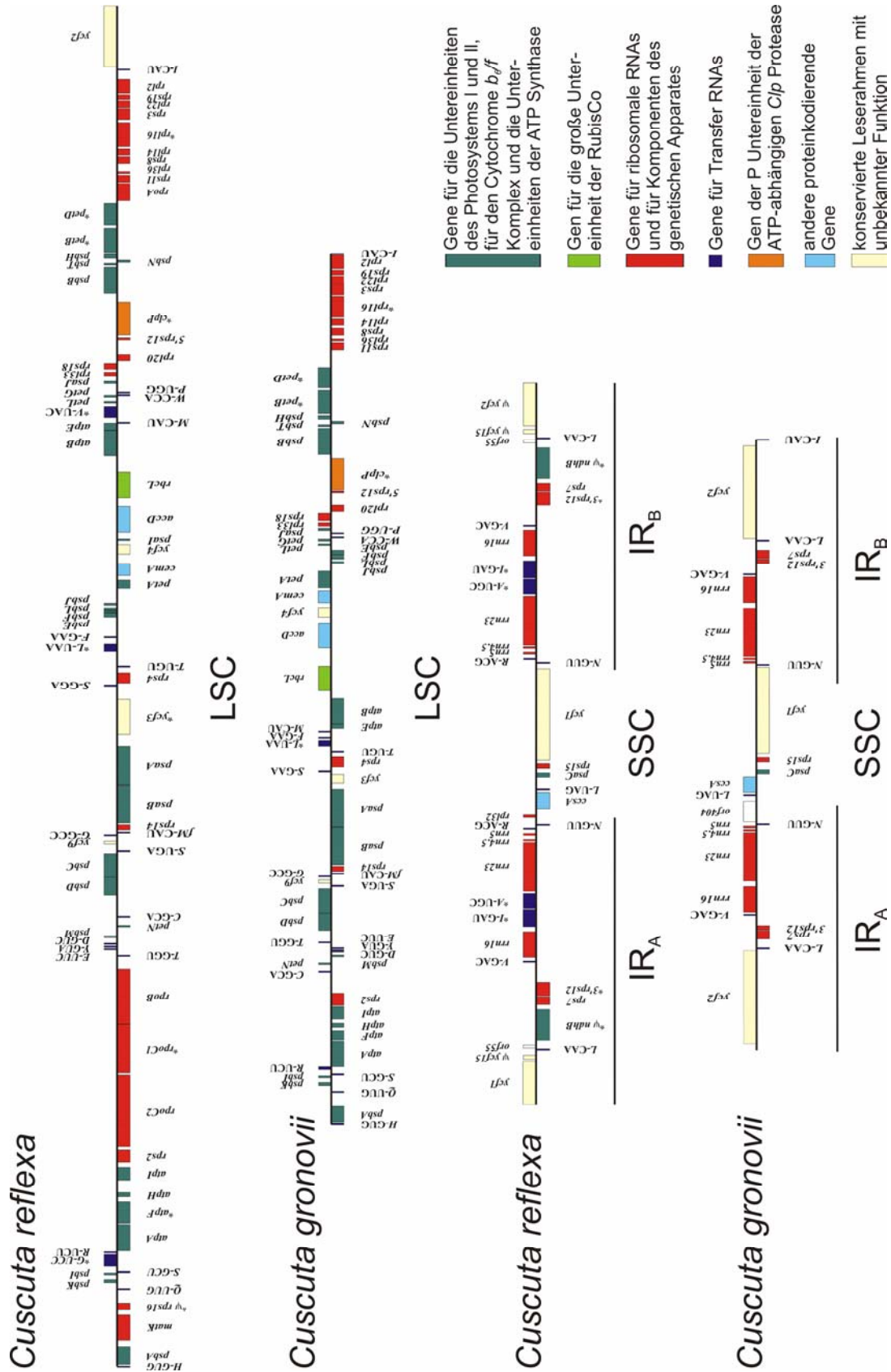
### 3.2.1 Struktur der Plastidengenome

Die beiden in dieser Arbeit sequenzierten Plastidengenome weisen einen für ein Plastidengenom typischen Aufbau auf (Abb. 3-2). In beiden Fällen unterteilen zwei umgekehrte Sequenzwiederholungen (*inverted repeat* A und B; IR<sub>A</sub> und IR<sub>B</sub>) zwei sich nicht wiederholende, unterschiedlich große Bereiche (*large* und *small single copy region*; LSC und SSC, vgl. Abb. 3-2 und Tab. 3-3). Überlappende PCR-Produkte weisen auf eine zirkuläre Form hin, jedoch kann eine definierte lineare Form der Plastidenchromosomen, wie es für *Zea mays* gezeigt werden konnte (siehe 1.2, Oldenburg and Bendich, 2004), nicht ausgeschlossen werden.

**Tab. 3-3: Eigenschaften der Plastidengenome von *Nicotiana tabacum*, *Cuscuta reflexa*, *Cuscuta gronovii* und *Epifagus virginiana***

	<i>N. tabacum</i>	<i>C. reflexa</i>	<i>C. gronovii</i>	<i>E. virginiana</i>
Größe [Bp]	155 939	121 521	86 744	70 028
LSC [Bp]	86 686	79 468	50 973	19 799
SSC [Bp]	18 571	8 571	7 063	4 759
IR [Bp]	25 341	16 741	14 354	22 735
kodierende Bereiche	49 %	69 %	75 %	43 %
A+T Gehalt	63 %	61.8 %	62.3 %	65 %
Gesamtanzahl der Gene	114	98	87	43
- Photosynthesegene	43	32	31	0
- Gene genetischer Apparat	30	28	22	21
- Gene für tRNAs	30	29	24	17
- sonstige Gene	11	9	10	5

Der Übergang von der LSC Region in die IR<sub>A</sub> Region liegt bei *C. reflexa* im *ycf2* Gen. *ycf2* liegt in den meisten bisher sequenzierten Plastidengenomen komplett in der IR Region. Durch diese Verkürzung der IR Region ist im Plastidengenom von *C. reflexa* jeweils nur eine vollständige Kopie von *ycf2*, *trnI*-CAU und *rpl2* zu finden (Abb. 3-2). Der Übergang von der IR<sub>A</sub> Region in die SSC Region ist im



**Abb. 3-2: Genkarte von *Cuscuta reflexa* und *Cuscuta gronovii***  
 Große und kleine Einzelkopierregionen (LSC und SSC) sind durch invertierte repetitive Bereiche (IR<sub>A</sub> und IR<sub>B</sub>) getrennt. Gene unterhalb der Linie werden von rechts nach links transkribiert und Gene oberhalb der Linie von links nach rechts; \* verweist auf Gene mit Introns. Pseudogene sind durch Ψ gekennzeichnet.

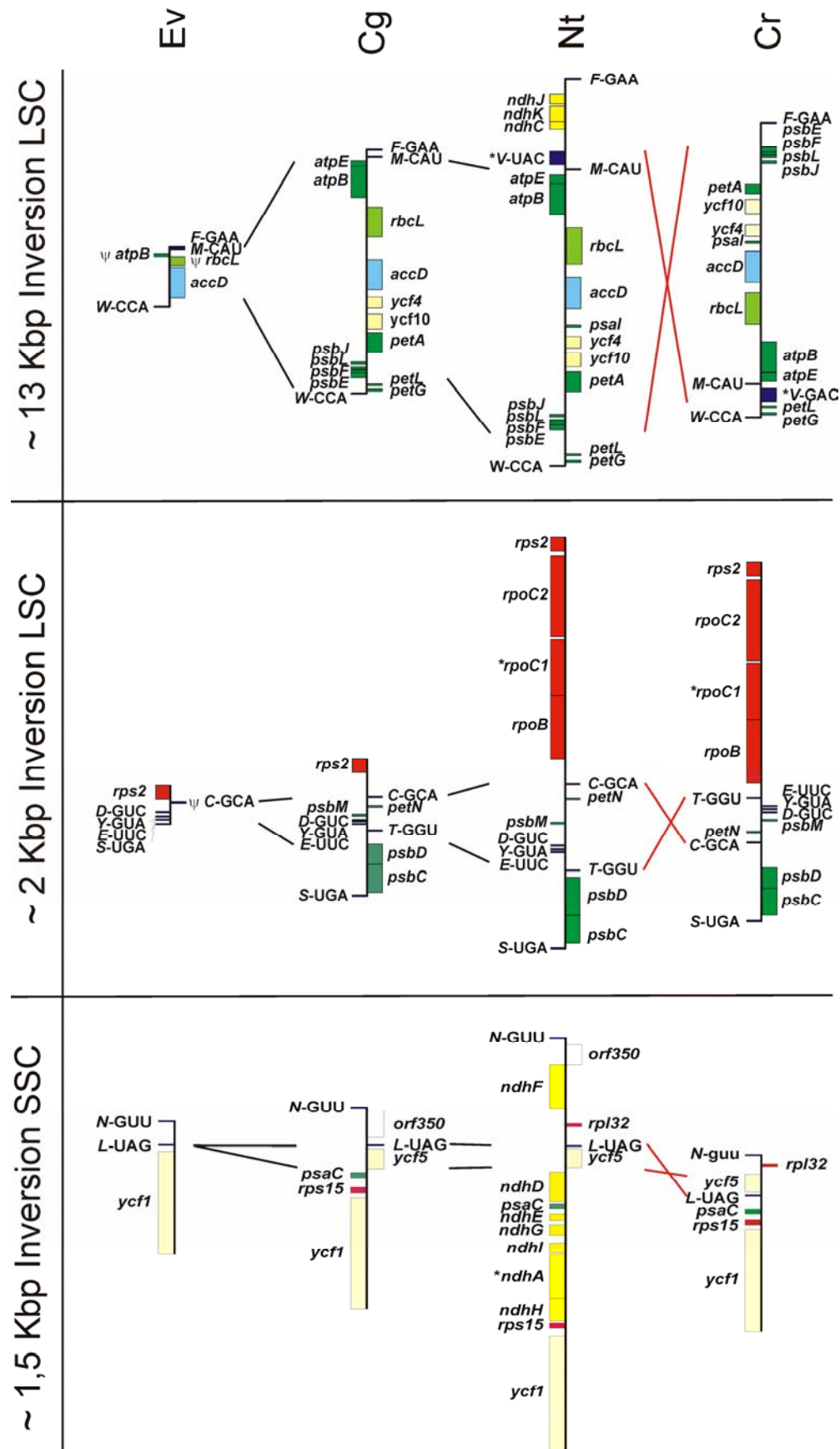


Abb. 3-3: Vergrößerte Darstellung der invertierten Sequenzbereiche in *Cuscuta reflexa* im Vergleich zu *Nicotiana tabacum*, *Cuscuta gronovii* und *Epifagus virginiana*

Cr: *C. reflexa*; Nt: *N. tabacum*; Cg: *C. gronovii*; Ev: *E. virginiana*; rote Linien: invertierte Bereiche in *C. reflexa*

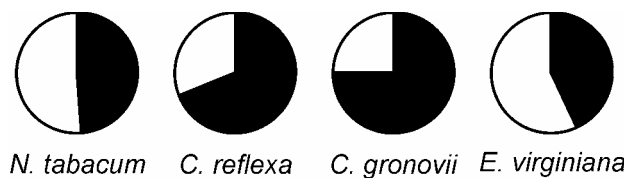
Vergleich zu *N. tabacum*, *C. gronovii* und den meisten anderen Plastidengenomen höherer Landpflanzen ebenfalls verschoben. Hier fehlt bei *C. reflexa* der häufig auftretende *orf*, der ein verkürztes Gen *ycf1* darstellt und dessen Funktion weder in der langen noch in der verkürzten Funktion bisher aufgeklärt ist.

Die Größe der Plastidengenome von *C. reflexa* (121 521 Bp) und *C. gronovii* (86 744 Bp) ist im Vergleich zu *N. tabacum* (155 939 Bp, Akzessionsnr.: z00044, Shinozaki *et al.*, 1986; Wakasugi *et al.*, 1998) deutlich reduziert (vgl. Tab. 3-3). Beide Plastidengenome sind jedoch größer als das bisher kleinste sequenzierte Plastidengenom höherer Landpflanzen des chlorophylllosen Wurzelparasiten *E. virginiana* mit 70 028 Bp (Akzessionsnr.: M81884, Wolfe *et al.*, 1992). Die Reduzierung der Größe der Plastidengenome, der in dieser Arbeit untersuchten parasitischen Arten, geht einher mit dem sukzessiven Verlust der Photosyntheseaktivität, der sich in einer deutlichen Reduzierung des Chlorophyllgehalts bis zum teilweise kompletten Verlust des Chlorophylls niederschlägt (Wolfe *et al.*, 1992; van der Kooij *et al.*, 2000; Hibberd and Jeschke, 2001).

Im Plastidengenom von *C. reflexa* wurden im Vergleich zu *C. gronovii* und anderen bereits sequenzierten Plastidengenomen höherer Landpflanzen drei invertierte Sequenzbereiche gefunden. Zwei dieser Bereiche liegen in der LSC Region und besitzen eine Länge von ~2 Kbp und ~13 Kbp während der dritte Bereich mit einer Länge von ~1,5 Kbp in der SSC Region lokalisiert ist (Abb. 3-3). Die 13 Kbp Inversion in der LSC Region betrifft die Gene von *psbE* bis *trnV-GAC*, die 2 Kbp Inversion die Gene *trnT-GGU* bis *trnC-GCA* und die 1,5 Kbp Inversion in der SSC Region nur die beiden Gene *ycf5* und *trnL-UAG*. Ein vergrößerter Ausschnitt der entsprechenden Bereiche von *C. reflexa* im Vergleich zu *N. tabacum*, *C. gronovii* und *E. virginiana* ist in Abb. 3-3 dargestellt.

Der AT-Gehalt von *C. reflexa* beträgt 61,8 % und von *C. gronovii* 62,5 %. Dies entspricht ungefähr dem AT-Gehalt von *N. tabacum* (63%) und *E. virginiana* (65%) (Tab. 3-3).

Setzt man den Anteil kodierender Bereiche ins Verhältnis zur Plastidengenomgröße, so ergibt sich für *N. tabacum* ein Wert von 49%. Der Anteil kodierender Bereiche ist bei *C. reflexa* auf 69% erhöht und bei *C. gronovii* sogar auf 75%. Der Prozentsatz an kodierenden Bereichen nimmt in den Plastidengenomen von *Cuscuta* mit Anpassung an die parasitische Lebensweise also deutlich zu. Anders verhält es sich bei *E. virginiana* der ähnlich wie *N. tabacum* mit 43% einen relativ niedrigen Prozentsatz an kodierenden Bereichen in dem Plastidengenom aufweist (Tab. 3-3 und Abb. 3-4).



**Abb. 3-4:** Schematische Darstellung der kodierenden Bereiche in *Nicotiana tabacum*, *Cuscuta reflexa*, *Cuscuta gronovii* und *Epifagus virginiana*

### 3.2.2 Kodierungskapazität der Plastidengenome

Sowohl *C. reflexa* als auch *C. gronovii* kodieren im Plastidengenom keine *ndh* Gene (siehe 1.2). Alle übrigen Gene, die typischerweise in einem Plastidengenom für Komponenten der Photosynthese kodieren (vgl. *N. tabacum* Tab. 3-4), sind im Plastidengenom von *C. reflexa* vorhanden. In *C. gronovii* ist neben den *ndh* Genen das *psaI* Gen deletiert, welches für eine Untereinheit des Photosystem I kodiert. In *E. virginiana* sind alle Photosynthesegene im Plastidengenom deletiert oder nur noch als Pseudogen vorhanden (Tab. 3-4, Wolfe *et al.*, 1992).

Tab. 3-4: Gengehalt der Plastidengenome von *Nicotiana tabacum*, *Cuscuta reflexa*, *Cuscuta gronovii* und *Epifagus virginiana*

Gene für Untereinheiten des Photosyntheseapparates und der NADH-Dehydrogenase					Gene für ribosomale Proteine					Gene für transfer RNAs				
	Nt	Cr	Cg	Ev		Nt	Cr	Cg	Ev		Nt	Cr	Cg	Ev
					<i>rrn16</i>	+	+	+	+	<i>trnA</i> -UGC	+	+	Ψ	Ψ
<i>atpA</i>	+	+	+	Ψ	<i>rrn23</i>	+	+	+	+	<i>trnC</i> -GCA	+	+	+	Ψ
<i>atpB</i>	+	+	+	Ψ	<i>rrn4.5</i>	+	+	+	+	<i>trnD</i> -GUC	+	+	+	+
<i>atpE</i>	+	+	+	-	<i>rrn5</i>	+	+	+	+	<i>trnE</i> -UUC	+	+	+	+
<i>atpF</i>	+	+	+	-						<i>trnF</i> -GAA	+	+	+	+
<i>atpH</i>	+	+	+	-						<i>trnI</i> -CAU	+	+	+	+
<i>atpI</i>	+	+	+	-	Gene für die RNA Polymerase und Maturase					<i>trnG</i> -GCC	+	+	+	-
<i>ndhA</i>	+	-	-	-						<i>trnG</i> -UCC	+	+	Ψ	-
<i>ndhB</i>	+	Ψ	-	Ψ						<i>trnH</i> -GUG	+	+	+	+
<i>ndhC</i>	+	-	-	-						<i>trnI</i> -CAU	+	+	+	+
<i>ndhD</i>	+	-	-	-		Nt	Cr	Cg	Ev	<i>trnI</i> -GAU	+	+	Ψ	Ψ
<i>ndhE</i>	+	-	-	-	<i>matK</i>	+	+	-	+	<i>trnK</i> -UUU	+	-	-	-
<i>ndhF</i>	+	-	-	-	<i>rpoA</i>	+	+	-	Ψ	<i>trnL</i> -CAA	+	+	+	+
<i>ndhG</i>	+	-	-	-	<i>rpoB</i>	+	+	-	-	<i>trnL</i> -UAA	+	+	+	-
<i>ndhH</i>	+	-	-	-	<i>rpoC1</i>	+	+	-	-	<i>trnL</i> -UAG	+	+	+	+
<i>ndhI</i>	+	-	-	-	<i>rpoC2</i>	+	+	-	-	<i>trnM</i> -CAU	+	+	+	+
<i>ndhJ</i>	+	-	-	-						<i>trnN</i> -GUU	+	+	+	+
<i>ndhK</i>	+	-	-	-						<i>trnP</i> -UGG	+	+	+	+
<i>petA</i>	+	+	+	-	Gene für ribosomale Proteine und den Initiationsfaktor					<i>trnQ</i> -UUG	+	+	+	+
<i>petB</i>	+	+	+	-						<i>trnR</i> -ACG	+	+	Ψ	+
<i>petD</i>	+	+	+	-						<i>trnR</i> -UCU	+	+	+	Ψ
<i>petG</i>	+	+	+	-							Nt	Cr	Cg	Ev
<i>petL</i>	+	+	+	-	<i>infA</i>	Ψ	-	-	+	<i>trnS</i> -GGA	+	+	+	Ψ
<i>petN</i>	+	+	+	-	<i>rpl14</i>	+	+	+	Ψ	<i>trnS</i> -UGA	+	+	+	+
<i>psaA</i>	+	+	+	-	<i>rpl16</i>	+	+	+	+	<i>trnT</i> -GGU	+	+	+	-
<i>psaB</i>	+	+	+	-	<i>rpl2</i>	+	+	+	+	<i>trnT</i> -UGU	+	+	+	-
<i>psaC</i>	+	+	+	-	<i>rpl20</i>	+	+	+	+	<i>trnV</i> -GAC	+	+	+	-
<i>psaI</i>	+	+	-	-	<i>rpl22</i>	+	+	+	-	<i>trnV</i> -UAC	+	+	-	-
<i>psaJ</i>	+	+	+	-	<i>rpl23</i>	+	Ψ	-	Ψ	<i>trnW</i> -CCA	+	+	+	+
<i>psbA</i>	+	+	+	Ψ	<i>rpl32</i>	+	+	-	-	<i>trnY</i> -GUA	+	+	+	+
<i>psbB</i>	+	+	+	Ψ	<i>rpl33</i>	+	+	+	+	Gene mit anderer bzw. unbekannter Funktion				
<i>psbC</i>	+	+	+	-	<i>rpl36</i>	+	+	+	+					
<i>psbD</i>	+	+	+	-	<i>rps11</i>	+	+	+	+	Nt	Cr	Cg	Ev	
<i>psbE</i>	+	+	+	-	<i>rps12</i>	+	+	+	+	<i>clpP</i>	+	+	+	+
<i>psbF</i>	+	+	+	-	<i>rps14</i>	+	+	+	+	<i>accD</i>	+	+	+	+
<i>psbH</i>	+	+	+	-	<i>rps15</i>	+	+	+	-	<i>ycf1</i>	+	+	+	+
<i>psbI</i>	+	+	+	-	<i>rps16</i>	+	Ψ	-	-	<i>ycf2</i>	+	+	+	+
<i>psbJ</i>	+	+	+	-	<i>rps18</i>	+	+	+	+	<i>ycf3</i>	+	+	+	-
<i>psbK</i>	+	+	+	-	<i>rps19</i>	+	+	+	+	<i>ycf4</i>	+	+	+	-
<i>psbL</i>	+	+	+	-	<i>rps2</i>	+	+	+	+	<i>ycf5</i>	+	+	+	-
<i>psbM</i>	+	+	+	-	<i>rps3</i>	+	+	+	+	<i>ycf9</i>	+	+	+	-
<i>psbN</i>	+	+	+	-	<i>rps4</i>	+	+	+	+	<i>ycf10</i>	+	+	+	-
<i>psbT</i>	+	+	+	-	<i>rps7</i>	+	+	+	+	<i>ycf15</i>	+	Ψ	Ψ	Ψ
<i>rbcl</i>	+	+	+	Ψ	<i>rps8</i>	+	+	+	+	<i>orf350</i>	+	-	+	+

Nt: *N. tabacum*; Cr: *C. reflexa*; Cg: *C. gronovii*; Ev: *E. virginiana*; + Gen ist im entsprechenden Plastidengenom kodiert; - nicht kodiert; Ψ als Pseudogen vorhanden. Daten für Nt: Akzessionsnr.: z00044 (Shinozaki *et al.*, 1986; Wakasugi *et al.*, 1998); Daten für Ev: Akzessionsnr.: M81884 (Wolfe *et al.*, 1992)

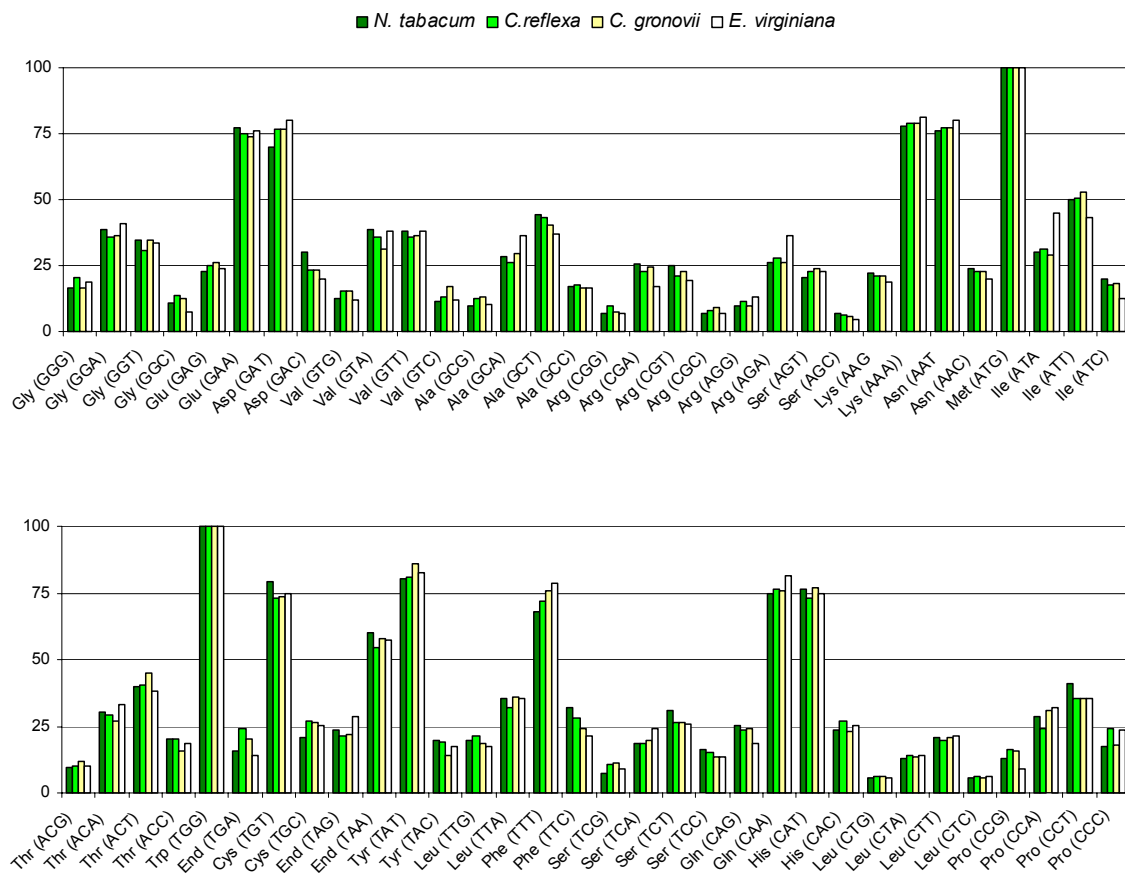


In den Plastidengenomen von *C. reflexa* und *C. gronovii* konnten nicht nur Deletionen, die Gene des Photosyntheseapparates betreffen, identifiziert werden, sondern ebenfalls Deletionen, die Gene des plastidären Genexpressionsapparates betreffen, beobachtet werden. Von den Genen für ribosomale Proteine sind im Plastidengenom von *C. reflexa* zwei, bei *C. gronovii* drei und bei *E. virginiana* insgesamt sechs Gene nicht mehr als funktionelles Leseraster vorhanden. Bei *C. reflexa* liegen sowohl *rpl23* als auch *rps16* nur als Pseudogene vor, d.h. es liegt hier wahrscheinlich ein relativ junger Funktionsverlust vor, im Gegensatz zu *C. gronovii* wo bereits *rpl23*, *rpl32* und *rps16* deletiert sind. Bei *E. virginiana* liegen *rpl14* und *rpl23* als Pseudogene vor und *rpl22*, *rpl32*, *rps15* und *rps16* sind komplett deletiert (Tab. 3-4, Wolfe *et al.*, 1992).

Von den typischerweise 30 tRNA Genen, die in einem Plastidengenom kodiert sind, fehlt bei *C. reflexa* *trnK*-UUU. Bei *C. gronovii* fehlen neben *trnK*-UUU fünf weitere funktionale tRNA Gene. So liegen *trnA*-UGC, *trnG*-UCC, *trnI*-GAU und *trnR*-ACG nur als Pseudogene vor während *trnV*-UAC bereits vollständig fehlt. In *E. virginiana* sind bereits 13 Gene von tRNAs nicht mehr im Plastidengenom kodiert. Überraschenderweise hat sich trotz dem teilweise massiven Verlust von tRNA Genen in den Plastidengenomen von *C. reflexa*, *C. gronovii* und *E. virginiana* die Kodon-Nutzung im Vergleich zu *N. tabacum* nicht nennenswert verändert. Es kommen alle 64 Kodons, wie in *N. tabacum*, in den kodierenden Bereichen der Plastidengnome von *C. reflexa*, *C. gronovii* und *E. virginiana* vor (für *E. virginiana* vgl. Wolfe *et al.*, 1992). In den Diagrammen in Abb. 3-5 ist die prozentuale Verteilung der Nutzung der einzelnen Kodons vergleichend für *N. tabacum*, *C. reflexa*, *C. gronovii* und *E. virginiana* dargestellt.

Im Plastidengenom von *C. gronovii* sind im Vergleich zu *C. reflexa* weitere Deletionen, die den plastidären Genexpressionsapparat betreffen, zu finden (Abb. 3-6). Diese betreffen die *rpo* Gene für die plastidär kodierten Untereinheiten der RNA Polymerase (siehe 3.3), die ebenfalls im Plastidengenom von *E. virginiana* nicht kodiert sind, sowie *matK*, das für einen putativen plastidär kodierten Spleißfaktor kodiert (siehe 3.4.1, Hess *et al.*, 1994; Liere and Link, 1995;

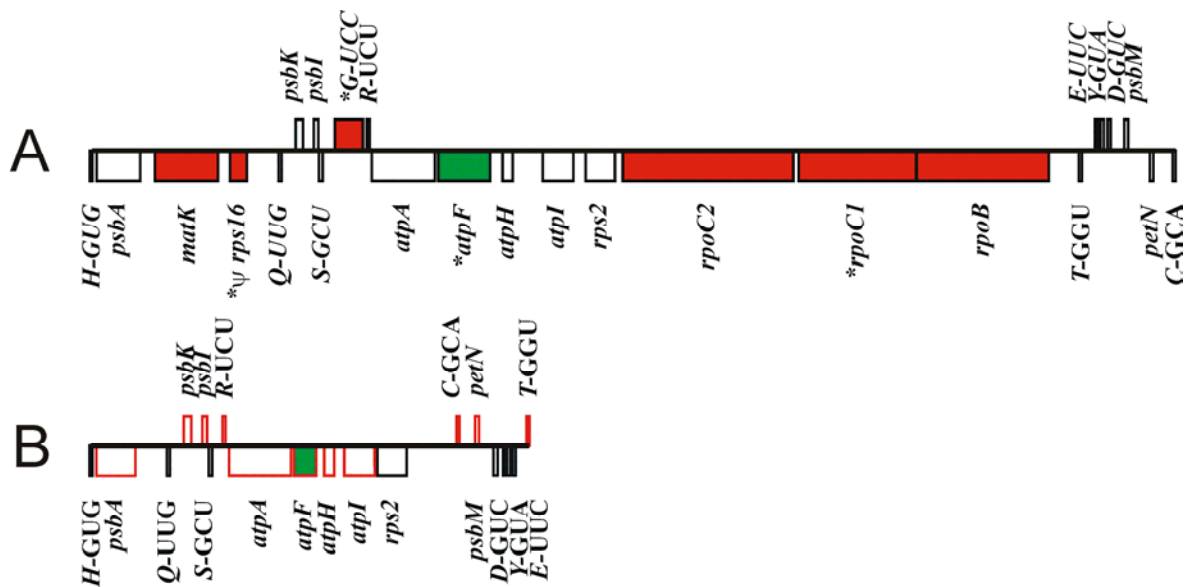
Hübschmann *et al.*, 1996; Jenkins *et al.*, 1997; Vogel *et al.*, 1997). In *E. virginiana* hingegen ist das *matK* Gen im Plastidengenom kodiert (Wolfe *et al.*, 1992). Das *infA* Gen, welches für einen prokaryotischen Translationsinitiationsfaktor kodiert, ist ebenfalls in beiden Plastidengenomen von *Cuscuta* deletiert (Tab. 3-4).



**Abb. 3-5: Plastidäre Kodonnutzung von *Nicotiana tabacum*, *Cuscuta reflexa*, *Cuscuta gronovii* und *Epifagus virginiana* im Vergleich**

x-Achse: die verschiedenen Aminosäuren mit den entsprechenden Kodons jeweils für *N. tabacum*, *C. reflexa*, *C. gronovii* und *E. virginiana* im Vergleich; y-Achse: Häufigkeit der entsprechenden Aminosäure in Prozent.

Neben den bereits beschriebenen Deletionen in den Plastidengenomen von *Cuscuta* konnten zwei weitere Gene nicht identifiziert werden. *ycf15* ist in beiden Plastidengenomen nur noch als Pseudogen zu finden und der *orf350*, welcher in vielen Plastidengenomen von Landpflanzen als verkürztes *ycf1* zu finden ist, ist bei *C. reflexa* durch die Verkürzung der IR Region nicht vorhanden (siehe 3.2.1). Bei *C. gronovii* ist das Homolog zu *orf350* durch den *orf404* an der entsprechenden Stelle kodiert (Tab. 3-4).



**Abb. 3-6:** Vergrößerte Darstellung des Bereichs von *H-GUG* bis *C-GCA* der Plastidengenome von *Cuscuta reflexa* und *Cuscuta gronovii* zur Veranschaulichung der Reduzierung der Plastidengenome aufgrund der parasitischen Lebensweise

A: *C. reflexa*, in rot markierte Gene sind in *C. gronovii* nicht mehr vorhanden, grün markiert: Das im Gen enthaltene Intron geht in *C. gronovii* verloren, das entsprechende Gen bleibt jedoch erhalten;  
B: *C. gronovii*, rot umrandete Gene sind bei *E. virginiana* im Plastidengenom verloren gegangen.

### 3.3 Vergleichende Analyse von PEP-Promotoren in *Nicotiana tabacum*, *Cuscuta reflexa* und *Cuscuta gronovii*

Durch die Deletion der Gene für die plastidär kodierte RNA Polymerase (PEP, *rpo*) in *C. gronovii* (siehe 3.2.2) und dem Erhalt der meisten Photosynthesegene, stellt sich die Frage nach der Transkription der normalerweise von der PEP transkribierten Gene. Gegen einen Transfer der *rpo* Gene in das Kerngenom sprechen einerseits Hybridisierungsstudien, in denen die *rpo* Untereinheiten der PEP in *C. gronovii* nicht nachgewiesen werden konnten (Krause *et al.*, 2003) und andererseits konnte für den *rbcL* und den *rrn16* Promotor bereits gezeigt werden, dass die Transkription von der nukleär kodierten RNA Polymerase (NEP) übernommen wird. Der Verlust der PEP sowie die Anpassung der entsprechenden Promotorregionen an die NEP führt dabei zu strukturellen Veränderungen der

entsprechenden 5'UTR Bereiche (Krause *et al.*, 2003; Berg *et al.*, 2004).

Eine vergleichende *in silico* Analyse, basierend auf den neuen Sequenzdaten, sollte zeigen ob sich solche Veränderungen auch in weiteren Promotorregionen finden. Ausgangspunkt hierfür stellen fünf Promotorregionen, welche in nicht parasitischen Pflanzen mit funktioneller PEP genauer charakterisiert sind. Dabei handelt es sich um die Promotorregionen der Gene *psaA* (Chen *et al.*, 1993), *psbA* (Shiina *et al.*, 2005), *psbD* (Christopher and Mullet, 1994; Nagashima *et al.*, 2004), *psbK* (Meng *et al.*, 1991) und *atpE* (Kapoor *et al.*, 1994) (Abb. 3-7).

Alle fünf untersuchten PEP-Promotorregionen sind verglichen mit *N. tabacum* in *C. reflexa* erhalten geblieben und nahezu identisch. *C. gronovii* hingegen weist in den meisten untersuchten PEP Promotorregionen deutliche Veränderungen auf, mit Ausnahme des *psaA* Promotors, der in allen drei untersuchten Arten konserviert ist (Abb.3-7 A).

In *C. gronovii* findet man bei den PEP Promotoren der analysierten Gene des Photosystems II Unterschiede. In *N. tabacum* und anderen photosynthetisch aktiven Plastiden wird das *psbA* Gen monocistronisch von einem PEP Promotor abgelesen. Dieser ist durch ein TATA ähnliches Sequenzmotiv und ein TGn Motiv zwischen der -10 und der -35 Box charakterisiert (Shiina *et al.*, 2005). In *C. reflexa* sind alle Sequenzmotive konserviert, in *C. gronovii* hingegen sind nur Homologien in der -10 Box zu finden (Abb. 3-7 B).

Die Gene *psbD* und *psbC* werden als Operon von mehreren PEP Promotoren aus transkribiert. Der am besten untersuchte *psbD* Promoter ist ein lichtabhängiger Promotor (LRP), der eine konservierte upstream Region (AGT) neben den typischen -10 und -35 Boxen aufweist. Das AGT Motiv ist in zwölf bisher untersuchten Pflanzenarten hoch konserviert (Hoffer and Christopher, 1997). Alle vier Promotor Motive sind in *C. reflexa* ebenfalls konserviert. In *C. gronovii* sind nur die -10 und die -35 Boxen konserviert, nicht aber die hoch konservierte upstream Region (Abb. 3-7 C). In beiden *Cuscuta* Spezies liegt der Promotorbereich jedoch deutlich näher am Translationsstart als in *N. tabacum* (Abb. 3-7 C).

A. *psaA* Promotor

-35
-10
└─▶

Nt TTAGAAGGTTAAAAGGTCCG**TTGAGC**GCCTCAAGGCTATGTCATA**ATAGATCC**-194nt-**ATG**  
 Cr AC.AT.TTAA...G.A.....A.C.T.....-188nt-**ATG**  
 Cg .G.AA.TAAA...G.....AA.AA.G.TA.....T**T**-126nt-**ATG**

B. *psbA* Promotor

-35
TATA-like  
box
T -10
└─▶

Nt TTG--G**TTGACAC**GAGTATATAAGTCA--TGTT**TATACT**GTTGA-87nt-**ATG**  
 Cr ...AC.....C..C.....--.....-87nt-**ATG**  
 Cg ..TCATA..**CTTG**.GAGT.CCTGA...TTAAA.....TAAT.-115nt-**ATG**

C. *psbD* LRP (Licht abhängiger) Promotor

konservierte  
upstream Region
-35
-10
└─▶

Nt GAAAAAGTAAGTGGACCTGACCTA**TTGAAT**CATGACTATATCCGC**TATTCT**GATATT**A**-904nt-**ATG**  
 Cr T.....A...C.....CG...T.....**C**-457nt-**ATG**  
 Cg .GTTG.C.CTA.TC.TTTA.TAAA..**T**...A.C.CG.CA.G.GA.....C.....**T**-447nt-**ATG**

D. *psbK* Promotor

-35
-10
└─▶

Nt AGAATTCAACTTAATTT**TTGAT**-CATTACATATAATTCAAT**TAAGATATT**GTAT**G**-163nt-**ATG**  
 Cr .T....A....G....G.....**A**...TG.....G.-137nt-**ATG**  
 Cg ..C.C.GC.AGG.....**A**..**TG**..ATA....T....T...CC..**TG**.A.T.**A**-134nt-**ATG**

E. *atpE* Promotor

-35
-10
└─▶

Nt CCCTGCTCCTGCTACGACAT**TTGCAC**ATTAGATGCTACTACCG**TACTAT**CAAGA**G**-431nt-**ATG**  
 Cr T.....C.....C.....A.....-439nt-**ATG**  
 Cg T.....A.....A.....T..**G**..**C**.....**A**-428nt-**ATG**

**Abb. 3-7: Vergleich der Promotorsequenzen von fünf PEP Promotoren in *Nicotiana tabacum*, *Cuscuta reflexa* und *Cuscuta gronovii***

Doppelstriche verweisen auf die Konsensusmotive des plastidären PEP Promoters, die -10 und -35 Boxen. Weitere konservierte Bereiche sind durch eine einfache Linie gekennzeichnet. Der Abstand zwischen Transkriptionsstart (Pfeil nach rechts) und dem Translationsstart (ATG) ist jeweils angegeben.

Der *psbK* Promotor in *N. tabacum* besteht aus einer -10 und einer -35 Box (Meng *et al.*, 1991), welche in *C. reflexa* konserviert sind, nicht jedoch in *C. gronovii* (Abb. 3-7 D).

Der *atpE* Promotor ist in *N. tabacum* ebenfalls durch eine -10 und eine -35 Box beschrieben worden (Kapoor *et al.*, 1994). Die -35 Box ist sowohl in *C. reflexa* als auch in *C. gronovii* konserviert, die -10 Box nur in *C. reflexa* (Abb. 3-7 E).

Die in dieser Arbeit vergleichend untersuchten Promotorregionen zeigen deutlich, dass der Verlust der PEP mit strukturellen Veränderungen der untersuchten 5'UTR Bereiche einhergeht. Die Veränderungen der 5'UTR Bereiche sind wahrscheinlich gekoppelt mit der Übernahme der Transkription durch eine kern-kodierte RNA Polymerase, die sich von der ursprünglichen PEP unterscheidet.

### **3.4 Posttranskriptionelle Prozessierungen der Transkripte von *Cuscuta reflexa* und *Cuscuta gronovii***

#### **3.4.1 Vorkommen und Spleißen plastidärer Introns in *Cuscuta reflexa* und *Cuscuta gronovii***

Das einzige Gruppe I Intron, welches typischerweise in einem Plastidengenom zu finden ist, liegt in *trnL*-UAA und ist sowohl bei *C. reflexa* als auch bei *C. gronovii* zu finden nicht jedoch bei *E. virginiana* (Tab. 3-5 und Abb. 3-8 C). Deutlich mehr plastidäre Introns gehören der Gruppe II an, welche in die Unterklassen IIA und IIB unterteilt ist (siehe 1.3.2, Michel *et al.*, 1989).

In *N. tabacum* sind, wie in den meisten Plastidengenomen höherer Landpflanzen, acht Gruppe IIA Introns zu finden. Ein Gruppe IIA Intron liegt in *trnK*-UUU, das sowohl bei *C. reflexa*, *C. gronovii* als auch bei *E. virginiana* nicht im Plastidengenom kodiert ist (siehe 3.2.2).

**Tab. 3-5: Übersicht über das Vorkommen von Introns in *Cuscuta reflexa*, *Cuscuta gronovii* und *Epifagus virginiana***

Gene (Nt)		<i>C. reflexa</i>	<i>C. gronovii</i>	<i>E. virginiana</i>
Gruppe I:				
	<i>trnL</i> -UAA	Intron	Intron	-
Gruppe II:				
A	<i>rps12</i> (Intron 2)	Intron	kein Intron	Intron
	<i>trnI</i> -GAU	Intron	Ψ	Ψ
	<i>trnA</i> -UGC	Intron	Ψ	Ψ
	<i>trnV</i> -UAC	Intron	-	-
	<i>trnK</i> -UUU	-	-	-
	<i>clpP</i> (Intron 2)	Intron	Intron	Intron
	<i>atpF</i>	Intron	kein Intron	-
	<i>rpl2</i>	kein Intron	kein Intron	Intron
B	<i>petB</i>	Intron	Intron	-
	<i>petD</i>	Intron	Intron	-
	<i>rps16</i>	-	-	-
	<i>rpoC1</i>	Intron	-	-
	<i>ycf3</i> (Intron 2)	Intron	kein Intron	-
	<i>clpP</i> (Intron 1)	Intron	Intron	Intron
	<i>rps12</i> (Intron 1 <i>trans</i> )	Intron	Intron	Intron
	<i>rpl16</i>	Intron	Intron	Intron
	<i>ndhB</i>	Ψ	-	Ψ
	<i>ndhA</i>	-	-	-
	<i>ycf3</i> (Intron 1)	Intron	kein Intron	-
	<i>trnG</i> -UCC	Intron	Ψ	-

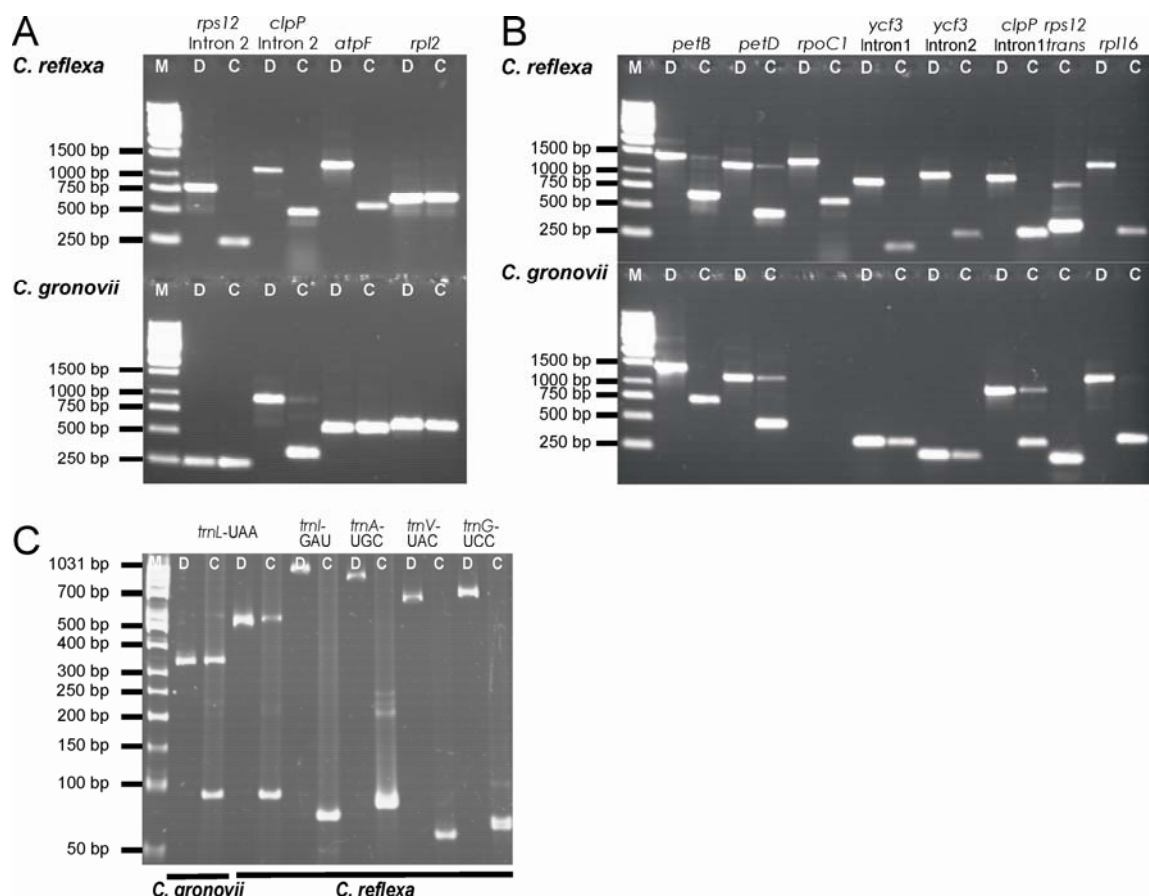
Aufgelistet sind alle Gene, die in *N. tabacum* (Nt) Introns besitzen. Intron: Gen mit Intron; kein Intron: Gen ohne Intron; -: Gen im entsprechendem Plastidengenom nicht kodiert; Ψ: Gen im entsprechendem Plastidengenom als Pseudogen vorhanden; *rps12* ist ein *trans*-gespleißtes Transkript, welches im 3' *trans*-Exon ein Intron (Intron 2) besitzt.

In *C. reflexa* ist der Leserahmen des *rpl2* Gens nicht von einem Gruppe IIA Intron unterbrochen, wie dies zum Beispiel bei *N. tabacum* der Fall ist. Die restlichen sechs der bei *N. tabacum* vorkommenden Gruppe IIA Introns, sind in *C. reflexa* in den entsprechenden Genen vorhanden und werden prozessiert (Tab. 3-5 und Abb. 3-8 A).

Von den acht in *N. tabacum* vorkommenden Gruppe IIA Introns liegen vier in tRNA Genen (siehe Tab. 3-5). Bei *C. gronovii* und bei *E. virginiana* sind unter

anderem diese vier tRNA Gene und mit ihnen die entsprechenden Introns deletiert (siehe 3.2.2). Die vier verbleibenden Gene mit Gruppe IIA Introns sind im Plastidengenom von *C. gronovii* erhalten geblieben, nicht jedoch alle Introns. So sind die Leseraster der Gene *rps12*, *atpF* und *rpl2*, die in *N. tabacum* jeweils durch ein Gruppe IIA Intron unterbrochen sind, in *C. gronovii* im Plastidengenom vorhanden, aber nicht durch Gruppe IIA Introns unterbrochen. Somit verbleibt lediglich ein einziges, der Gruppe IIA zugeordnetes Intron im Plastidengenom von *C. gronovii*. Hierbei handelt es sich um das Intron 2 in *clpP*, welches, genau wie in *N. tabacum*, *C. reflexa* und *E. virginiana*, prozessiert wird (Abb. 3-9).

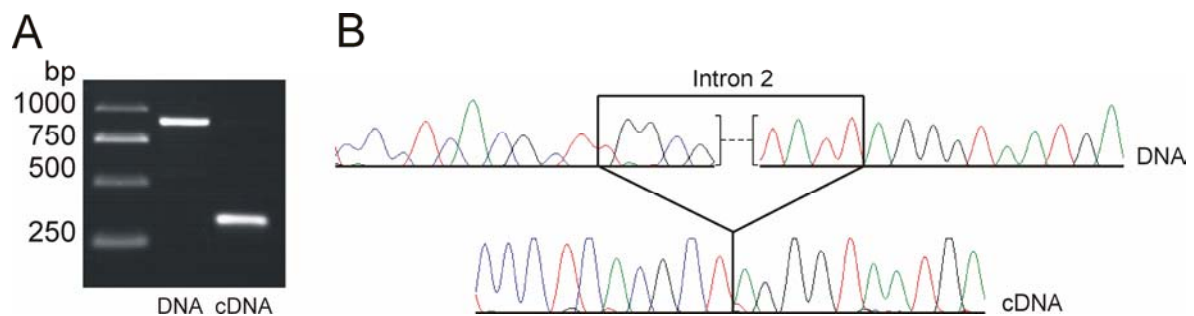
Die in *E. virginiana* vorhandenen Gruppe IIA Introns in den Genen *rps12* (Intron 2), *clpP* (Intron 2) und *rpl2* sind von Ems *et. al.* 1995 untersucht worden und werden prozessiert.



**Abb. 3-8: Nachweis der Introns bzw. Verlust der Introns mittels PCR/RT-PCR**

A: Gruppe IIA Introns; B: Gruppe IIB Introns, *rpoC1* ist in *C. gronovii* deletiert; C: Introns in tRNA Genen; M: Marker; D: PCR Produkt (DNA); C: RT-PCR Produkt (cDNA)





**Abb.3-9: Spleißen des Intron 2 von *clpP* in *Cuscuta gronovii***

A: PCR (DNA) und RT-PCR (cDNA) Produkte, die das Intron 2 von *clpP* überspannen B: DNA und cDNA Sequenzen der Exon/Intron Übergänge von *clpP* am Intron 2

Von den insgesamt zwölf Gruppe IIB Introns im Plastidengenom von *N. tabacum* sind in *C. reflexa* aufgrund der Deletion der Gene *rps16*, *ndhA* und *ndhB* (siehe 3.2.2 und Tab. 3-5) nur neun zu finden, welche ausnahmslos prozessiert werden.

Für *C. gronovii* unterscheidet sich die Situation bezüglich der erhaltenen Gruppe IIB Introns. Zusätzlich zum Verlust von fünf Gruppe IIB Introns aufgrund der Deletion der entsprechenden Gene, *rps16*, *rpoC1*, *ndhA*, *ndhB* und *trnG-UCC*, konnte ein Verlust zweier weiterer Gruppe IIB Introns im *ycf3* Gen identifiziert werden. Die Funktion von *ycf3* scheint jedoch erhalten zu sein, zumindest ist das vollständige Leseraster im Plastidengenom von *C. gronovii* vorhanden (Abb. 3-8 B und Tab. 3-5).

Im Vergleich dazu sind in *E. virginiana* aufgrund von Deletionen der entsprechenden Gene nur drei Gruppe IIB Introns in den Genen *clpP*, *rps12* und *rpl16* im Plastidengenom vorhanden (vgl. Tab.3-5, Wolfe *et al.*, 1992; Ems *et al.*, 1995).

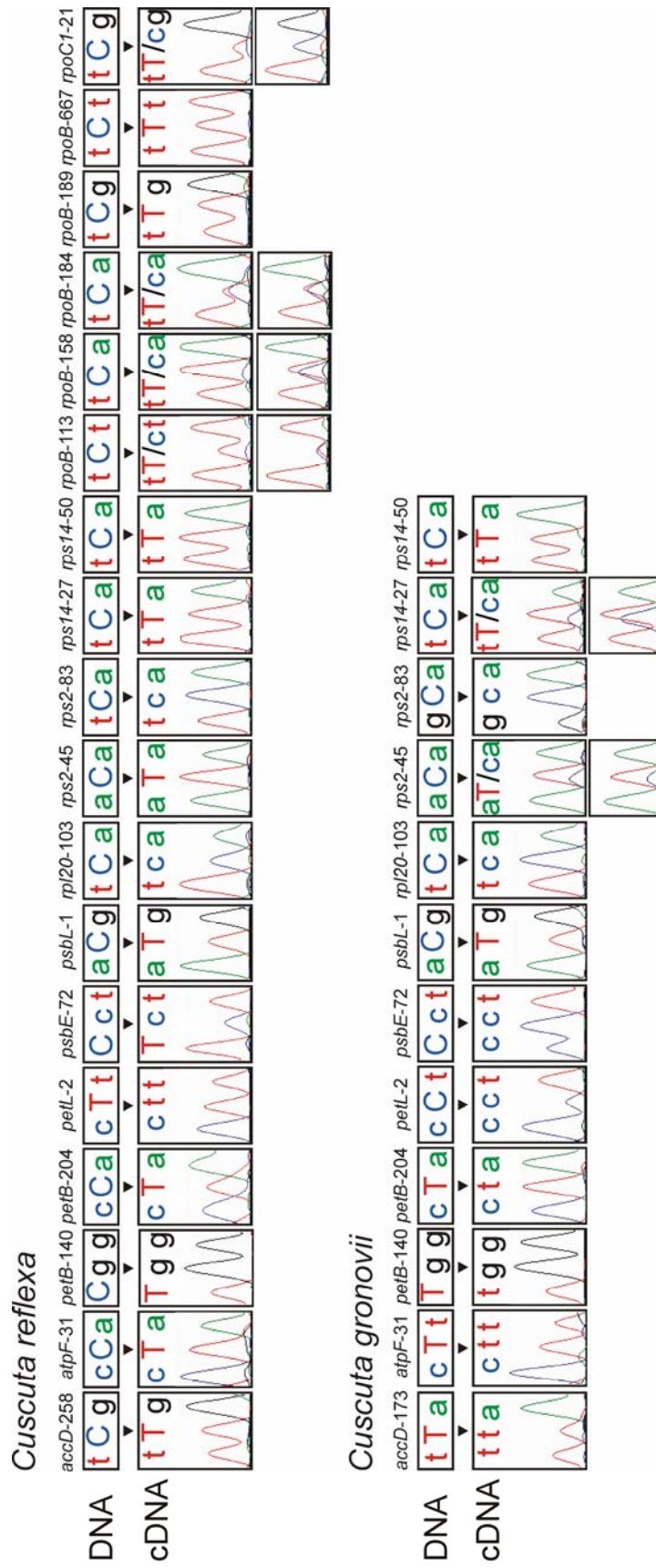
### 3.4.2 Bestimmung der Editotypen von *Cuscuta reflexa* und *Cuscuta gronovii*

Für die Bestimmung der Editotypen von *C. reflexa* und *C. gronovii* wurde zuerst eine *in silico* Analyse zur Bestimmung potentieller Edierungsstellen durchgeführt. Hierbei wurden alle bekannten Edierungsstellen aus Plastiden höherer Landpflanzen auf DNA Ebene in *Cuscuta* untersucht. Alle identifizierten potentiellen Edierungsstellen sind in Tabelle 3-6 zusammengefasst. Die Chromatogrammausschnitte in Abb. 3-10 zeigen den Edierungsstatus aller untersuchten Edierungsstellen.

Tab. 3-6: Edierungsstellen in *Cuscuta reflexa* und *Cuscuta gronovii*

Gene	Position	<i>C. reflexa</i>			<i>C. gronovii</i>	
		kons.	Kodon		Kodon	
<i>accD</i>	258/173	L	tCg	S > L	tta	L
<i>atpF</i>	31	L	cCa	P > L	ctt	L
<i>petB</i>	140	W	Cgg	R > W	tgg	W
	204	L	cCa	P > L	cta	L
<i>petL</i>	2	L	ctt	L	cct	P
<i>psbE</i>	72	S	Cct	P > S	cct	P
<i>psbL</i>	1	M	aCg	T > M	aCg	T > M
<i>rpl20</i>	103	L	tca	S	tca	S
	113	L	tCt	<b>S &gt; F*</b>		
	158	L	tCa	<b>S &gt; L*</b>		
<i>rpoB</i>	184	L	tCa	S > L*		
	189	L	tCg	S > L		nicht kodiert
	667	F	tCt	S > F		
<i>rpoC1</i>	21	L	tCg	<b>S &gt; L*</b>		
<i>rps2</i>	45	I	aCa	T > I	aCa	T > I*
	83	L	tca	S	gca	A
<i>rps14</i>	27	L	tCa	S > L	tCa	<b>S &gt; L*</b>
	50	L	tCa	S > L	tCa	S > L

Position: Aminosäureposition im Gen; kons.: konservierte Aminosäure an der entsprechenden Position; „C“ im Kodon: Edierungsstelle; großes „C“ ediert; kleines „c“ unediert; \*: partielle Edierung; Fett: höhere Edierungseffizienz in grünem Gewebe



**Abb. 3-10: Sequenzausschnitte der Edierungsstellen von *Cuscuta reflexa* und *Cuscuta gronovii***  
 „C“ im Kodon: Edierungsstelle; „T“ im Kodon: Thymidin bereits auf DNA Ebene kodiert; obere Chromatogramme: grünes Gewebe; untere Chromatogramme: bleiches Gewebe

In *C. reflexa* konnten insgesamt 17 potentielle Edierungsstellen identifiziert werden. Für 15 der potentiellen Edierungsstellen konnte Edierung nachgewiesen werden. Von den 15 identifizierten Edierungsstellen werden elf voll prozessiert und die restlichen vier nur partiell ediert. Die potentiellen Edierungsstellen im *rp120* Gen an Aminosäureposition 103 und im *rps2* Gen an Aminosäureposition 83 verbleiben unediert (Tab.3-6 und Abb. 3-10).

Im Plastidengenom von *C. gronovii* konnten insgesamt sieben potentielle Edierungsstellen identifiziert werden, von denen vier ediert werden. Zwei der vier identifizierten Edierungsstellen werden partiell ediert. Vier Edierungsstellen, die aus *C. reflexa* bekannt sind, *accD*-258, *atpF*-31, *petB*-140 und *petB*-204 besitzen in *C. gronovii* bereits ein Thymidin auf DNA Ebene (Tab.3-6 und Abb. 3-10). Dies bedeutet, dass auf mRNA Ebene die Kodierung an der entsprechenden Aminosäureposition in *C. reflexa* und in *C. gronovii* jeweils gleich ist. Während in *C. reflexa* die Kodierung durch Edierung im Vergleich zur genomischen Sequenzinformation verändert wird, bedarf es in *C. gronovii* an keiner der oben genannten Aminosäurepositionen einer Modifikation der mRNA, um ein Protein mit der jeweils konservierten Aminosäure zu erhalten.

Wie bei *C. reflexa* verbleiben die Edierungsstellen *rp120*-103 und *rps2*-83 in *C. gronovii* unediert. Zusätzlich sind noch zwei weitere Edierungsstellen betroffen. So konnte Edierung an der in *C. reflexa* edierten Stelle *psbE*-72 in *C. gronovii* nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls nicht ediert wird das entsprechende Cytosin in Kodon 2 von *petL* in *C. gronovii* (Tab. 3-6 und Abb. 3-10). Dies ist erstaunlich, da durch Edierung das Kodon für die konservierte Aminosäure (Leucin), die in *C. reflexa* bereits auf DNA Ebene kodiert ist, an dieser Stelle in *C. gronovii* hergestellt werden könnte. Somit bleibt für diese zwei Aminosäurepositionen der genomische Unterschied zwischen *C. reflexa* und *C. gronovii* auch auf mRNA Ebene erhalten.

Es konnte für verschiedene Edierungsstellen bereits mehrfach gezeigt werden, dass die Edierungseffizienz in nicht photosynthetisch aktivem Gewebe für manche Edierungsstellen geringer ist als in photosynthetisch aktivem Gewebe (Hirose *et al.*, 1999; Peeters and Hanson, 2002; Chateigner-Boutin and Hanson, 2003).

Daher wurden alle in *Cuscuta* partiell edierten bzw. unediert verbleibenden Edierungsstellen vergleichend in grünem und in bleichem Gewebe untersucht. Bei drei der vier partiellen Edierungsstellen in *C. reflexa* und bei einer der beiden partiellen Edierungsstellen in *C. gronovii* konnte in photosynthetisch aktiverem Gewebe (*C. reflexa*: Sprossspitzen; *C. gronovii*: Sprosse, die zwei Tage ohne Wirtspflanze gewachsen sind) eine höhere Edierungseffizienz nachgewiesen werden (siehe Abb. 3-10).

In einer *in silico* Analyse der DNA Sequenz des Plastidengenoms von *E. virginiana* konnten neben der bereits beschriebenen Edierungsstelle *rps12-74* (Ems *et al.*, 1995), vier weitere potentielle Edierungsstellen identifiziert werden (*rps2-45*, *rps2-83*, *rps14-27* und *rps14-50*).

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Größe, Struktur und Kodierungspotential der Plastidengenome

Die Plastidengenome von *C. reflexa* und *C. gronovii* sind deutlich kleiner als das Plastidengenom von *N. tabacum*. Mit einer Größe von 121,5 Kbp liegt das Plastidengenom von *C. reflexa* jedoch noch im Bereich einiger nicht parasitischer und photosynthetisch aktiver Landpflanzen. Zum Beispiel besitzen die japanische Schwarzkiefer (*Pinus thunbergii*) mit einer Größe von 119,7 Kbp (Wakasugi *et al.*, 1994), Reis (*Oryza sativa*) mit 134,5 Kbp (Hiratsuka *et al.*, 1989), das kleine Blasenmützenmoos (*Physcomitrella patens*) mit 122,9 Kbp (Sugiura *et al.*, 2003) und das Brunnenlebermoos (*Marchantia polymorpha*) mit 121 Kbp (Yamano *et al.*, 1984) ein ähnlich großes Plastidengenom. *C. gronovii* hat im Vergleich zu *C. reflexa* ein bereits deutlich reduziertes Plastidengenom, jedoch sind beide Plastidengenome deutlich größer als das des photosynthetisch inaktiven Parasiten *E. virginiana*. Die Reduzierung der Plastidengenome geht einher mit der Reduzierung der Photosyntheseaktivität der parasitischen Pflanzen.

Die Variation der Plastidengenomgrößen kommt zum größten Teil durch die unterschiedlich großen intergenischen Bereiche bzw. durch die unterschiedlich großen IR Bereiche (*inverted repeats*) zu Stande. Mit zunehmender Abhängigkeit von der Wirtspflanze werden im Fall von *Cuscuta* sowohl die IR Bereiche als auch die nicht kodierenden intergenischen Bereiche deutlich kleiner (vgl. Tab. 3-3). Die kodierenden Bereiche bei nicht parasitischen und photosynthetisch aktiven Landpflanzen können jedoch im Vergleich zu *N. tabacum* (49%) ebenfalls leicht erhöht sein, wie dies zum Beispiel bei *Pinus thunbergii* mit 61% der Fall ist. Der erhöhte Wert von *C. reflexa* (69%) liegt, wie bei der Plastidengenomgröße, in einem ähnlichen Bereich wie die leicht erhöhten Werte bei einzelnen

photosynthetisch aktiven Landpflanzen. *E. virginiana* besitzt hingegen mit 43%, im Vergleich zu *Cuscuta*, einen relativ niedrigen Prozentsatz an kodierenden Bereichen. Eine Erklärung hierfür wäre, dass *E. virginiana* durch den Verlust des Photosyntheseapparates am stärksten von der Wirtspflanze abhängig ist und im Vergleich zu den beiden hier untersuchten *Cuscuta* Arten das am stärksten reduzierte Plastidengenom besitzt, jedoch die Deletionen der Gene relativ jung sind. Dies deutet sich durch die höhere Anzahl an Pseudogenen an, die noch im Plastidengenom von *E. virginiana* vorhanden sind. Im Laufe der Evolution wäre eine Reduzierung der intergenischen Bereiche, zu denen die Pseudogene zählen, denkbar und damit eine Erhöhung des Anteils der kodierenden Bereiche.

Von den bei *C. reflexa* im Vergleich zu anderen Plastidengenomen gefundenen invertierten Sequenzbereiche ist eine bereits 1992 von Haberhausen *et. al.* beobachtet worden. Diese 13 Kbp Inversion in der LSC Region (Abb. 3-3) konnte ebenfalls bei *C. japonica* beobachtet werden (Stefanovic and Olmstead, 2005). Stefanovic *et. al.* 2005 schlug vor, dass diese Inversion spezifisch für die Untergattung *Monogyna* ist, da diese bisher nur bei *C. reflexa* und *C. japonica* (beide Untergattung *Monogyna*) beobachtet werden konnte. Da die beiden weiteren bei *C. reflexa* gefundenen Inversionen ebenfalls nicht bei *C. gronovii* (Untergattung *Grammica*) auftreten und bisher noch nicht in anderen *Cuscuta* Arten beschrieben worden sind, könnten diese ebenfalls für die Untergattung *Monogyna* spezifisch sein. Da sowohl die oben beschriebenen invertierten Sequenzbereiche als auch die Verkürzung der IR Region möglicherweise für die Untergattung *Monogyna* spezifisch sind, ist es denkbar, dass diese unabhängig von der parasitischen Lebensweise entstanden sind.

Eine weitere Auffälligkeit des Aufbaus des Plastidengenoms von *C. reflexa* ist die Verschiebung bzw. die Verkürzung des IR Bereichs, verglichen mit anderen Plastidengenomen höherer Landpflanzen. Haberhausen *et. al.* 1992 beschrieb die Deletion des *rpl2* Gens zusammen mit *rpl23* und *trnI*-CAU im Plastidengenom von *C. reflexa*. Stefanovic *et. al.* 2005 hingegen konnte das *rpl2* Gen in *C. japonica*

nachweisen und schlug eine Verkürzung der IR Region vor und daher nur eine Kopie von *rpl2*. Diese Annahme konnte in dieser Arbeit für *C. reflexa* bestätigt werden, da im Vergleich zu anderen bereits sequenzierten Plastidengenomen eine Verschiebung des LSC-IR Übergangs in das *ycf2* Gen und eine Verschiebung des SSC-IR Übergangs gefunden wurde (Abb.3-2). Die betroffenen Gene *ycf2*, *rpl2* und *trnI*-CAU liegen daher nur in einfacher Kopie vor. Durch die Verschiebung des SSC-IR Übergangs ist im Plastidengenom von *C. reflexa* kein Homolog zu dem *orf350* aus *N. tabacum* zu finden, dessen Funktion bisher noch nicht geklärt ist. Es ist schwer zu beurteilen, ob diese verkürzte Form, des als essentiell geltenden *ycf1* (Boudreau *et al.*, 1997; Drescher *et al.*, 2000), nur eine eingeschränkte Bedeutung für die Funktionalität der Plastiden hat oder das Fehlen nur durch die parasitische Lebensweise von *C. reflexa* toleriert werden kann.

Die Kodierungskapazität der verschiedenen bisher sequenzierten Plastidengenome von höheren Landpflanzen ist bis auf einzelne Ausnahmen konserviert (Martin *et al.*, 1998). Bei parasitischen Pflanzen ist zu beobachten, dass - höchstwahrscheinlich aufgrund ihrer Lebensweise - die Anzahl der im Plastidengenom kodierten Gene abnimmt (vgl. Tab. 3-3 und 3-4). Bei den in dieser Arbeit untersuchten *Cuscuta* Arten sind interessanterweise kaum Gene für Untereinheiten der Photosynthese betroffen, wie dies bei dem chlorophylllosen Parasiten *E. virginiana* der Fall ist, sondern überwiegend Gene, die für den plastidären genetischen Apparat kodieren. In den verschiedenen, bisher untersuchten photosynthetisch aktiven Pflanzenarten sind typischerweise immer die gleichen Komponenten des Photosyntheseapparates in den Plastidengenomen kodiert (Martin *et al.*, 1998). Es handelt sich hierbei hauptsächlich um die Hauptkomponenten der Elektronentransportkette des Photosyntheseapparates. John F. Allen erklärt dies durch die CORR-Hypothese (*co-location for redox regulation*, Allen, 1993; Allen, 2003). In dieser Hypothese wird der Erhalt des Plastidengenoms und damit ein bestimmter Satz an Genen damit begründet, dass die Transkription der im Plastidengenom erhaltenen Photosynthesegene einer direkten Redoxkontrolle der Genprodukte unterliegt. Dadurch wird die Redoxbalance in den Chloroplasten



aufrechterhalten und somit eine Anhäufung von schädlichen Sauerstoffradikalen verhindert. Solange Photosynthese betrieben wird, wie das zum Beispiel bei *C. reflexa* der Fall ist, scheint es trotz der parasitischen Lebensweise noch von Vorteil zu sein, die entsprechenden Gene im Plastidengenom zu kodieren und diese somit individuell in den jeweiligen Chloroplasten regulieren zu können. Im Gegensatz zu *C. reflexa* besitzt *C. gronovii* keine plastidär kodierte RNA Polymerase (PEP) mehr (siehe 4.2). Daher könnte bei *C. gronovii* die Redoxkontrolle der entsprechenden Gene stark eingeschränkt sein (vgl. Allen, 1993; Allen, 2003). Bei der gewöhnlich sehr geringen Photosyntheseleistung von *C. gronovii* könnte spekuliert werden, dass die Entstehung von schädlichen Sauerstoffradikalen ebenso gering ist und somit wenig ins Gewicht fällt. Während kurzer Phasen mit erhöhter Photosyntheseleistung, beispielsweise zum Überleben ohne Wirt, könnte ein erhöhtes Aufkommen an schädlichen Substanzen, von den im Vergleich zu photosynthetisch aktiven Pflanzen in parasitischen Pflanzen teilweise vermehrt vorkommenden Antioxidantien wie Tocopherolen und Carotinoiden (van der Kooij *et al.*, 2000; van der Kooij *et al.*, 2005) abgefangen werden. Trotz der wahrscheinlich starken Einschränkung der Redoxkontrolle in Folge des Verlustes der plastidär kodierten RNA Polymerase (PEP) ist bei *C. gronovii* bisher kein massiver Verlust an Photosynthesegenen zu beobachten. Dies könnte einen relativ jungen Verlust der PEP andeuten. Im Laufe der Evolution könnten bei *C. gronovii*, unter anderem aufgrund der fehlenden Redoxkontrolle in Verbindung mit der parasitischen Lebensweise, die restlichen Photosynthesegene deletiert werden und damit die Fähigkeit Photosynthese zu betreiben verloren gehen.

*C. reflexa* und *C. gronovii* können Photosynthese betreiben und besitzen dementsprechend noch fast alle normalerweise im Plastidengenom kodierten Gene für die Photosynthese (siehe oben). Nicht kodiert sind jedoch die *ndh* Gene (*ndhA-K*). Diese sind bei beiden *Cuscuta* Arten bereits vollständig deletiert, oder nur noch, wie im Fall von *ndhB*, als Pseudogen vorhanden. Die *ndh* Gene kodieren für elf Untereinheiten des NDH Komplexes in Chloroplasten (NAD(P)H Dehydrogenase siehe 1. 2, Meng *et al.*, 1986), der Homologien zu dem mitochondrialen Komplex I

(NADH Dehydrogenase) aufweist (Matsubayashi *et al.*, 1987). Die Funktion des NDH Komplexes in den Chloroplasten konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Der NDH Komplex wird unter oxidativen Stressbedingungen aktiviert (Casano *et al.*, 2001) und ist möglicherweise im Licht am zyklischen Elektronentransport und im Dunkeln vermutlich an der Chlororespiration beteiligt (Burrows *et al.*, 1998). Es konnte ebenfalls eine Beteiligung des NDH Komplexes bei der Seneszenz von Blättern beobachtet werden (Zapata *et al.*, 2005). Der NDH Komplex scheint jedoch nicht essentiell für eine funktionelle Photosynthese zu sein. Bei verschiedenen Mutanten, die Komponenten des NDH Komplexes betreffen, konnte unter Standardbedingungen kein offensichtlicher Phänotyp beobachtet werden (Burrows *et al.*, 1998; Kofer *et al.*, 1998; Shikanai *et al.*, 1998; Horvath *et al.*, 2000). Verschiedene *ndh* Mutanten deuten an, dass die Effizienz der Photosynthese unter Standardbedingungen auch ohne NDH abhängigen zyklischen Elektronentransport ausreichend ist (Burrows *et al.*, 1998; Shikanai *et al.*, 1998; Munekage *et al.*, 2004). Unter den nicht parasitischen und photosynthetisch aktiven Landpflanzen gibt es mit *Pinus thunbergii* einen Vertreter, der ebenfalls ohne plastidär kodierte *ndh* Gene Photosynthese betreiben kann (Wakasugi *et al.*, 1994). Die in *Cuscuta* ablaufenden photosynthetischen Prozesse sind offensichtlich nicht auf einen NDH abhängigen zyklischen Elektronentransport angewiesen. Am Beispiel von *Pinus thunbergii* wird klar, dass dies nicht zwangsläufig mit einer parasitischen Lebensweise zusammenhängt. Ein funktioneller Transfer der *ndh* Gene in das Kerngenom ist daher eher unwahrscheinlich, kann aber zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Die Plastidengenome von *C. gronovii* und *E. virginiana* unterscheiden sich in ihrer Größe nur um 17 Kbp auf welchen in *C. gronovii* hauptsächlich die Untereinheiten für den Photosyntheseapparat zu finden sind, welche bei *E. virginiana* bereits alle deletiert sind. Im Plastidengenom von *C. gronovii* ist neben den *ndh* Genen (siehe oben) als einzige weitere Komponente des Photosyntheseapparates das Gen *psaI* deletiert. Dieses kodiert für eine Untereinheit des Photosystems I. Der knock-out des *psaI* Gens in *Synechocystis* sp 6803 zeigt nur eine geringe

Auswirkung auf die Funktionalität des Photosystem I (Chitnis and Chitnis, 1993; Xu *et al.*, 1995). Die *psaI* knock-out Mutanten besitzen keine Photosystem I Trimere, ein Phänomen, welches ebenfalls bei *psaL* knock-out Mutanten auftritt (Chitnis and Chitnis, 1993). Der knock-out von *psaI* deutet an, dass die Funktion von *PsaI* die strukturelle Organisation von *PsaL* ist (Xu *et al.*, 1995). Es kann jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass das *psaI* Gen in das Kerngenom von *C. gronovii* transferiert wurde und ein funktionelles *PsaI* in die Chloroplasten importiert wird. Aufgrund der stark reduzierten Photosyntheseleistung von *C. gronovii* ist es jedoch denkbar, dass *PsaI* in *C. gronovii* abkömmlisch ist.

Weitere Deletionen in den Plastidengenomen der beiden untersuchten *Cuscuta* Arten betreffen Gene des genetischen Apparates. So liegen zwei Gene für ribosomale Proteine (*rpl23* und *rps16*) nur noch als Pseudogene im Plastidengenom von *C. reflexa* vor, bei *C. gronovii* ist zusätzlich noch *rpl32* deletiert und bei *E. virginiana* sind insgesamt sechs Gene für ribosomale Proteine deletiert bzw. nur noch als Pseudogene vorhanden (vgl. Tab. 3-4, Wolfe *et al.*, 1992). In Chloroplasten werden ca. 60 ribosomale Proteine benötigt von denen gewöhnlich 21 im Plastidengenom kodiert sind. Der größere Anteil der in der Plastide benötigten ribosomalen Proteine ist somit im Kern kodiert (Subramanian, 1993). Da der genetische Apparat in *Cuscuta* noch funktionsfähig ist, sind die entsprechenden Gene wahrscheinlich in das Kerngenom transferiert worden und die entsprechenden Proteine werden funktionell in die Chloroplasten importiert. Die Deletion von *rpl23* und von *rps16* im Plastidengenom wurde schon in anderen photosynthetisch aktiven angiospermen Pflanzen beschrieben. *rpl23* ist im Plastidengenom von Spinat nur noch als Pseudogen vorhanden (Thomas *et al.*, 1988; Schmitz-Linneweber *et al.*, 2001) und fehlt im Plastidengenom von *E. virginiana* (Wolfe *et al.*, 1992). Die Deletion von *rps16* ist sowohl im Plastidengenom des Lebermooses *Marchantia polymorpha* (Ohya *et al.*, 1986) als auch bei *E. virginiana* (Wolfe *et al.*, 1992) beobachtet worden. Der gemeinsame Verlust sowohl von *rps16* sowie von *rpl23* in einem Plastidengenom konnte bisher nur bei parasitisch lebenden

Pflanzen beobachtet werden.

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei den Genen für tRNAs. Bei *C. reflexa* ist eine, bei *C. gronovii* sind sechs und bei *E. virginiana* sind dreizehn Gene für tRNAs nicht mehr im Plastidengenom kodiert (Tab. 3-4). Ebenso, wie bei den Genen für die ribosomalen Proteine ist es unwahrscheinlich, dass die entsprechenden tRNAs in den Chloroplasten nicht mehr benötigt werden, da die Genexpression in den Plastiden noch funktionell ist (siehe oben). So wird zum Beispiel Lysin durch das Kodon AAA kodiert für welches die entsprechende plastidär kodierte tRNA sowohl bei *C. reflexa* als auch bei *C. gronovii* fehlt. Trotzdem wird das entsprechende Kodon im Plastidengenom der beiden untersuchten *Cuscuta* Arten mit annähernd gleicher Häufigkeit verwendet, wie bei *N. tabacum*. In den kodierenden Bereichen im Plastidengenom von *N. tabacum* wird die Aminosäure Lysin mit 77,81%, bei *C. reflexa* mit 79,21% und bei *C. gronovii* mit 79,15% durch das Kodon AAA kodiert. Ein ähnliches Bild zeigt sich für die fünf weiteren in dem Plastidengenom von *C. gronovii* nicht mehr vorhandenen tRNA Gene (siehe Tab 4-1). Der in den Plastidengenomen von photosynthetisch aktiven Pflanzen kodierte tRNA Satz ist nach den entsprechenden „wobble“ Regeln ausreichend, um alle 64 Kodons abzudecken (Pfitzinger *et al.*, 1990). Auffallend ist, dass in *C. reflexa* ein und in *C. gronovii* zwei Kodons für Aminosäuren (Alanin und Lysin) betroffen sind, die in einem typischen Plastidengenom jeweils nur durch ein tRNA Gen abgedeckt sind. Im Plastidengenom von *E. virginiana* sind zusätzlich zu den bereits genannten betroffenen Kodons keine tRNAs für die Kodons für die Aminosäuren Cystein, Glycin, Threonin und Valin kodiert. In den untersuchten parasitischen Arten sind daher die noch im Plastidengenom kodierten tRNAs nicht mehr ausreichend, um alle Kodons abzudecken. In Mitochondrien ist im Gegensatz zu Plastiden nicht mehr der komplette Satz an tRNAs kodiert. Die in den Mitochondrien nicht kodierten tRNAs werden aus dem Cytosol importiert (Bhattacharyya and Adhya, 2004). Ein tRNA Import in die Chloroplasten ist bisher noch nicht beschrieben worden. Für *E. virginiana* wird ein Import von cytosolischen tRNAs bzw. ein Transfer der entsprechenden Gene in das Kerngenom mit anschließendem Reimport der tRNAs vorgeschlagen (Morden *et al.*, 1991; Wolfe *et al.*, 1992). Für die

fehlenden tRNAs in den Plastidengenomen von *C. reflexa* und *C. gronovii* scheint dies ebenfalls möglich, da sich die Kodonnutzung zwischen *N. tabacum*, *C. reflexa* und *C. gronovii* nicht wesentlich unterscheidet (siehe Abb. 3-5). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass eine Importmaschinerie erst in den parasitischen Pflanzen entstanden ist. Morden *et. al.* 1991 und Wolfe *et. al.* 1992 schlugen vor, dass die Importmaschinerie bereits in photosynthetisch aktiven Arten vorhanden ist. Der Erhalt eines kompletten tRNA Sets im Plastidengenom von photosynthetisch aktiven Arten deutet an, dass tRNAs nur in einem geringen Ausmaß in die Chloroplasten importiert werden und eine Deletion einzelner tRNA Gene nur in den Arten möglich ist, die zum Überleben nicht auf eine hohe Translationsrate angewiesen sind, wie dies möglicherweise auf die parasitischen Arten zutrifft.

**Tab. 4-1: Kodonnutzung von Kodons für die entsprechende tRNA die nicht im Plastidengenom kodiert ist**

Kodon (Aminosäure)	Nt	Cr	Cg
GCT (Ala)	44,52 %	43,36 %	<b>40,43 %</b>
GGT (Gly)	34,42 %	30,50 %	<b>34,38 %</b>
ATC (Ile)	19,72 %	17,66 %	<b>18,10 %</b>
AAA (Lys)	77,81 %	<b>79,21 %</b>	<b>79,15 %</b>
CGT (Arg)	24,95 %	20,87 %	<b>22,67 %</b>
GTA (Val)	38,68 %	35,87 %	<b>31,07 %</b>

Fett: Kodonnutzung betroffener Kodons deren tRNA im jeweiligen Plastidengenom nicht kodiert sind; Nt: *N. tabacum*; Cr: *C. reflexa*; Cg: *C. gronovii*

Die Deletion des *infA* Gens im Plastidengenom, welches für einen prokaryotischen Translationsinitiationsfaktor kodiert, ist in vielen angiospermen Pflanzen bereits nachgewiesen worden. *infA* liegt zum Beispiel im Plastidengenom von *N. tabacum* nur als Pseudogen vor (Shinozaki *et al.*, 1986). Ebenfalls ist der Verlust des *infA* Gens im Plastidengenom für die Gattung *Convolvulus* beschrieben worden (Millen *et al.*, 2001), die der gleichen Familie (*Convolvulaceae*) wie *Cuscuta* zugeordnet ist. Jedoch konnte für *infA* ein mehrfach unabhängiger Transfer in das Kerngenom nachgewiesen werden (Millen *et al.*, 2001). Es ist daher wahrscheinlich, dass bei *Cuscuta* das *infA* Gen nicht komplett verloren gegangen ist, sondern ebenfalls in das Kerngenom transferiert worden ist.

Bei den Genen, die für den genetischen Apparat kodieren, sind mit zunehmender Abhängigkeit der Parasiten von der Wirtspflanze zunehmende Deletionen von Genen im Plastidengenom zu beobachten. Für einen Teil der im Plastidengenom deletierten Gene muss davon ausgegangen werden, dass diese in das Kerngenom transferiert worden sind bzw. die entsprechenden Komponenten aus dem Cytosol in die Chloroplasten funktionell importiert werden. Hieraus ergibt sich eine steigende Abhängigkeit des Chloroplasten vom Kern mit zunehmender Abhängigkeit des Parasiten von der Wirtspflanze.

#### **4.2 Transkription der Plastideng Genome von *Cuscuta reflexa* und *Cuscuta gronovii***

Bei *C. reflexa* sind die *rpo* Gene, die für Untereinheiten der plastidär kodierten RNA Polymerase (PEP) kodieren, wie bei nicht parasitisch lebenden Pflanzen, im Plastidengenom kodiert. Die PEP ist hauptsächlich für die Transkription der Photosynthesegene verantwortlich (Hajdukiewicz *et al.*, 1997). Die Transkription der plastidären Gene und hier der Photosynthesegene in *C. reflexa* sollte sich demnach nicht grundlegend von der Transkription der Gene von Plastiden höherer, nicht parasitisch lebender Landpflanzen unterscheiden. Bisher wurden in *C. reflexa* zwei PEP Promotoren genauer untersucht. Der *rrn16* Promotor (Krause *et al.*, 2003) und der *rbcL* Promotor (Berg *et al.*, 2004), welche beide in *C. reflexa* vorhanden und funktionell sind. In dieser Arbeit konnten anhand einer *in silico* Analyse die Sequenzmotive von fünf bisher in Landpflanzen untersuchten PEP Promotoren in *C. reflexa* identifiziert werden (Abb: 3-7).

*C. gronovii* hat die *rpo* Gene im Plastidengenom verloren. Die bisher beschriebenen Deletionen von *rpo* Genen in Plastidengenomen ohne Transfer in das Kerngenom beschränkten sich auf parasitischen Pflanzen (z. B. *E. virginiana*), die keine Photosynthese mehr betreiben (Morden *et al.*, 1991; Delavault and

Thalouarn, 1994; Krause *et al.*, 2003). *C. gronovii* besitzt im Plastidengenom jedoch noch fast alle Photosynthesegene und ist eingeschränkt in der Lage Photosynthese zu betreiben (van der Kooij *et al.*, 2000).

Verschiedene PEP-defiziente Mutanten weisen einen weißen Phänotyp auf (Allison *et al.*, 1996; De Santis-Maciossek *et al.*, 1999). Dies zeigt, dass ohne funktionelle PEP die Genexpression in Plastiden offensichtlich massiv gestört ist. Für solche Mutanten konnte jedoch gezeigt werden, dass die kernkodierte Phagentyp RNA Polymerase (als NEP bezeichnet) alle Gene in einem Plastidengenom transkribieren kann (Krause *et al.*, 2000; Legen *et al.*, 2002). Krause *et al.* 2003 konnte in *C. gronovii* für den *rrn16* Promotor und Berg *et al.* 2004 für den *rbcL* Promotor zeigen, dass die Transkription der entsprechenden Gene tatsächlich von der kernkodierten Phagentyp RNA Polymerase (NEP) übernommen wird. Für eine (funktionelle) Übernahme der Transkription der entsprechenden Gene durch eine nukleär kodierte RNA Polymerase müssen entsprechende Promotormotive vorhanden sein. Im Vergleich zu den Promotormotiven der PEP bindet die NEP an relativ einfache und daher häufig vorkommende Promotormotive (YRTA) (Liere and Maliga, 1999). Die fünf in dieser Arbeit untersuchten PEP Promoterregionen sind bei *C. gronovii*, im Gegensatz zu *C. reflexa*, nicht konserviert und weisen deutlich veränderte 5'UTR Bereiche auf (Abb. 3-7). Da ein Transfer der *rpo* Gene in das Kerngenom aufgrund von Hybridisierungsstudien ausgeschlossen werden kann (vgl. 1.3.1, Krause *et al.*, 2003) und *C. gronovii* noch in der Lage ist Photosynthese zu betreiben, müssen die entsprechenden Gene von einer kernkodierten RNA Polymerase nicht-plastidären Ursprungs transkribiert werden. Dies geht mit den Veränderungen in den untersuchten Promotorregionen einher.

Obwohl bereits für PEP defiziente Mutanten gezeigt werden konnte, dass die NEP auch Photosynthesegene transkribieren kann, ohne dass Veränderungen in den Promotorregionen nötig sind (Krause *et al.*, 2000; Legen *et al.*, 2002), gibt es doch erhebliche Unterschiede zwischen der PEP defizienten Art *C. gronovii* und den PEP defizienten Mutanten. Schließlich ist *C. gronovii* – wenn auch stark eingeschränkt – in der Lage Photosynthese zu betreiben, während dies für die

beschriebenen PEP defizienten Mutanten nicht der Fall ist. Die quantitativ stark reduzierten NEP-Transkripte, der normalerweise von der PEP transkribierten Gene, die in den PEP-defizienten Mutanten identifiziert werden konnten, werden nicht translatiert (Legen *et al.*, 2002). Die Veränderung der Promotorstrukturen und der 5' UTR Bereiche in *C. gronovii* sind also augenscheinlich ausschlaggebend dafür, dass in den Plastiden die jeweiligen Transkripte in einer translationsfähigen Form vorliegen. Möglicherweise ist neben einer weniger effizienten Transkription durch die NEP auch der Translationsprozess der entsprechenden NEP-Transkripte weniger effizient, und stellt somit einen weiteren Faktor dar, der in *C. gronovii* zu einer eingeschränkten Photosyntheseleistung führt. Weiterhin ist es sehr wahrscheinlich, dass durch den Verlust der PEP die Redoxkontrolle der Transkription (siehe 4.1) deutlich eingeschränkt ist.

Alle diese Einschränkungen durch den Verlust der PEP können wahrscheinlich nur durch die parasitische Lebensweise toleriert werden und sind ein weiterer Schritt der zu einer Reduzierung des Plastidengenoms aufgrund der parasitischen Lebensweise führt. Im Laufe der Evolution könnte bei *C. gronovii* der Verlust des Photosyntheseapparates denkbar sein, da dieser durch die bereits beschriebenen Einschränkungen nur noch auf einem geringen Level funktioniert und durch die parasitischen Lebensweise von *C. gronovii* der evolutionäre Druck auf die Erhaltung der Photosynthese relativ schwach ist.

### **4.3 Verlust des plastidär kodierten Spleißfaktors MatK in *Cuscuta gronovii*?**

*C. gronovii* ist bisher die einzige Pflanze bei der das *matK* Gen, das für den putativen Spleißfaktor MatK kodiert, im Plastidengenom nicht kodiert ist. *matK* ist typischerweise in den Plastidengenomen im Intron des tRNA Gens *trnK-UUU* kodiert. MatK weist Ähnlichkeiten zu mitochondriell kodierten Maturasen auf,



welche als Spleißfaktoren bekannt und ebenfalls jeweils in einem Intron kodiert sind (Neuhaus and Link, 1987). MatK ist der bisher einzige identifizierte plastidär kodierte Spleißfaktor. Die zunächst einzige beobachtete Ausnahme, hinsichtlich der Kodierung von *matK* innerhalb des Introns von *trnK*-UUU, war *E. virginiana*, wo *matK* im Plastidengenom zu finden ist und *trnK*-UUU nicht im Plastidengenom kodiert ist (Wolfe *et al.*, 1992; Ems *et al.*, 1995). Das gleiche Bild ergab die Sequenzanalyse für *C. reflexa*, wo *matK* ebenfalls im Plastidengenom zu finden ist, nicht jedoch *trnK*-UUU. In *E. virginiana* sind drei Gruppe IIA Introns im Plastidengenom vorhanden, welche alle prozessiert werden (Ems *et al.*, 1995). Alle Gruppe IIA Introns im Plastidengenom von *C. reflexa* werden ebenfalls prozessiert (siehe Abb. 3-8). Wenn MatK tatsächlich für das Spleißen der Gruppe IIA Introns verantwortlich ist (Hess *et al.*, 1994; Liere and Link, 1995; Hübschmann *et al.*, 1996; Jenkins *et al.*, 1997; Vogel *et al.*, 1997; Vogel *et al.*, 1999), muss es auch in der freistehenden Form funktionell sein (vgl. Ems *et al.*, 1995).

Bei *C. gronovii* geht der Verlust des *matK* Gens einher mit dem Verlust der entsprechenden Gruppe IIA Introns. Entweder sind die normalerweise Gruppe IIA Introns enthaltenden Gene komplett verloren gegangen oder aber ohne das entsprechende Intron im Plastidengenom zu finden (siehe Tab. 3-5). Die einzige Ausnahme ist das Intron 2 von *clpP*, welches bei *C. gronovii* erhalten ist und gespleißt wird (siehe Abb. 3-9). Es ist bisher wenig über die Faktoren, die für das Spleißen des Intron 2 von *clpP* benötigt werden bekannt. Für die Bestimmung der Introns, die von einem plastidär kodierten Spleißfaktor prozessiert werden, wurden ribosomenfreie Mutanten verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Gersten- (*albostrans*) (Hess *et al.*, 1994; Hübschmann *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1997; Vogel *et al.*, 1999) und eine Maismutante (*iojap*) (Jenkins *et al.*, 1997). Da sowohl in Mais als auch in Gerste in *clpP* keine Introns vorhanden sind, konnte bisher keine Aussage bezüglich plastidär kodierter Faktoren, die am Spleißen von *clpP* beteiligt sind, gemacht werden. Vor kurzem konnte jedoch für das Moos *Physcomitrella patens* gezeigt werden, dass ein nukleär-kodiertes PPR-Protein (*Pentatricopeptid Repeat*) am Spleißen von *clpP* beteiligt ist (Hattori *et al.*, 2007).

Für ein weiteres Gruppe IIA Intron im *atpF* Gen konnte gezeigt werden, dass neben MatK auch der kernkodierte Faktor Crs1p zum Spleißen des *atpF* Introns notwendig ist (Jenkins *et al.*, 1997). Es ist also durchaus möglich, dass für das Spleißen des Introns 2 von *clpP* in *C. gronovii* nicht MatK sondern ausschließlich Kernfaktoren verantwortlich sind. In diesem Fall müsste *matK* nicht in das Kerngenom transferiert worden sein, da außer dem Intron 2 von *clpP* alle anderen Gruppe IIA Introns nicht mehr im Plastidengenom von *C. gronovii* zu finden sind.

Wenn MatK in *C. gronovii* tatsächlich nicht mehr vorhanden ist, so sind zusammen mit der PEP zwei in nicht parasitischen und photosynthetisch aktiven Pflanzen als essentiell geltende Faktoren der Genexpression verloren gegangen. Es deutet sich hier eine drastische Veränderung der Genexpression mit zunehmender Abhängigkeit der parasitischen Pflanzen von der Wirtspflanze an.

#### 4.4 RNA Edierung in Plastiden von parasitischen Pflanzen

In angiospermen Landpflanzen sind im Durchschnitt ca. 30 Edierungsstellen pro Plastidengenom zu finden (Tab. 4-2). Ein großer Anteil dieser Edierungsstellen befindet sich typischerweise in den *ndh* Genen, welche in den beiden sequenzierten Plastidengenomen von *Cuscuta* fehlen (siehe 3.2.2). Für *Cuscuta* würde man daher im Durchschnitt von ca. 15 relevanten Edierungsstellen pro Plastidengenom ausgehen (siehe Tab. 4-2). Die Anzahl von 17 potentiellen Edierungsstellen, welche in *C. reflexa* identifiziert wurden, liegt also im erwarteten Bereich.

Interessanterweise verbleiben in *C. reflexa* zwei Edierungsstellen unediert, die Edierungsstellen *rpl20-103* und *rps2-83*. Beide Aminosäurepositionen sind in photosynthetisch aktiven Landpflanzen hoch konserviert. Entweder ist das jeweilige konservierte Kodon bereits auf DNA Ebene kodiert, oder es wird durch RNA Edierung hin zur konservierten Form verändert wie dies für *rpl20-103* in *N. tabacum*, *Atropa belladonna*, *Hordeum vulgare* und *Zea mays* beschrieben ist

(Wakasugi *et al.*, 1996; Hirose *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 2001; Tillich *et al.*, 2001; Schmitz-Linneweber *et al.*, 2002; Funk *et al.*, 2004). Sowohl in *C. reflexa* als auch in *C. gronovii* verbleibt diese Stelle unediert, d.h. die untersuchte cDNA weist an der entsprechenden Position jeweils ein Serinkodon (tCa) und nicht das entsprechend konservierte Leucinkodon (tta) auf. Für nicht parasitische und photosynthetisch aktive Pflanzen konnte für verschiedene Edierungsstellen gezeigt werden, dass Edierung an bestimmten Positionen für die Funktion des Proteins essentiell ist (siehe 1.3.3, Bock *et al.*, 1994; Hirose and Sugiyura, 1997; Zito *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 2001; Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005). Somit wäre eine Funktionsstörung in Folge der fehlenden Edierung an dieser Stelle in *C. reflexa* und *C. gronovii* denkbar, die nur durch die parasitische Lebensweise von *Cuscuta* toleriert werden kann. Möglicherweise ist die Rpl20 Isoform mit einem Serin an Aminosäureposition 103 aber auch spezifisch für *Cuscuta*.

**Tab. 4-2: relevante Edierungsstellen für *Cuscuta***

	Edierungsstellen insgesamt	davon in <i>ndh</i> Genen	relevante Edierungs- stellen in <i>Cuscuta</i>
Nt	35 <sup>1</sup>	19	16
Ab	32 <sup>2</sup>	18	14
At	28 <sup>3</sup>	17	11
Os	22 <sup>4</sup>	14	8
Zm	29 <sup>5</sup>	15	14

Nt: *N. tabacum*; Ab: *Atropa belladonna*; At: *Arabidopsis thaliana*; Os: *Oryza sativa*; Zm: *Zea mays*; <sup>1</sup>: (Hirose *et al.*, 1999); <sup>2</sup>: (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2002); <sup>3</sup>: (Tillich *et al.*, 2005); <sup>4</sup>: (Corneille *et al.*, 2000); <sup>5</sup>: (Maier *et al.*, 1995; Tillich *et al.*, 2001)

Die *rps2*-83 Edierungsstelle (Serin (uCa) → Leucin (uUa)) ist aus *N. tabacum* und *A. belladonna* bekannt (Hirose *et al.*, 1999; Schmitz-Linneweber *et al.*, 2002) und ist auch in *Spinacea oleracea* und *E. virginiana* vorhanden, jedoch ist diese Stelle hier bisher noch nicht experimentell überprüft worden. In allen anderen untersuchten Pflanzen ist bereits das konservierte Leucinkodon (tTa) auf DNA Ebene kodiert. Bei *C. reflexa* verbleibt, wie bei der *rpl20*-103 Edierungsstelle, das Serinkodon (uCa) unediert. In *C. gronovii* ist an der Aminosäureposition 83 von *rps2* hingegen ein Alanin (gCa) zu finden, welches durch Edierung auf mRNA

Ebene nicht in ein Valin (gUa) umgewandelt wird (siehe Abb. 3-10). Dies bedeutet, dass in *C. gronovii* auch durch Edierung nicht das Kodon für die konservierte Aminosäure Leucin hergestellt werden könnte. Somit kann in beiden *Cuscuta* Arten auch durch Edierung auf mRNA Ebene nicht der genomische Unterschied aufgehoben werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass aufgrund der parasitischen Lebensweise von *Cuscuta*, für *C. reflexa* eine Isoform von Rps2 mit einem Serin an Aminosäureposition 83 und für *C. gronovii* eine Isoform mit einem Alanin an der entsprechenden Stelle spezifisch ist.

Bei *C. gronovii* sind weit weniger Edierungsstellen im Plastidengenom zu finden als bei *C. reflexa*. Dies kommt erstens durch den Verlust der *rpo* Gene zu Stande (sechs Edierungsstellen in *C. reflexa*) und zweitens dadurch, dass für vier in *C. reflexa* identifizierte Edierungsstellen in *C. gronovii* bereits die konservierte Aminosäure auf DNA Ebene kodiert ist (*accD*-173, *atpF*-31, *petB*-140 und 204). Neben *rpl20*-103 und *rps2*-83 verbleiben in *C. gronovii* noch zwei weitere potentielle Edierungsstellen unediert. Hierbei handelt es sich um die Edierungsstellen *petL*-2 und *psbE*-72. In *C. reflexa* ist an der Aminosäureposition 2 von *petL* bereits das konservierte Leucin (cTt) auf DNA Ebene kodiert und an Aminosäureposition 72 in *psbE* wird das auf DNA Ebene kodierte Prolinkodon (Cct) auf mRNA Ebene durch Edierung in das konservierte Serinkodon (Ucu) überführt. In *C. reflexa* scheint daher die jeweils konservierte Aminosäure für die Funktion der entsprechenden Proteine wichtig zu sein, da diese entweder bereits auf DNA Ebene kodiert ist oder durch Edierung auf mRNA Ebene hergestellt wird. Im Gegensatz dazu kann in *C. gronovii* die unedierte Form der entsprechenden Proteine anscheinend toleriert werden.

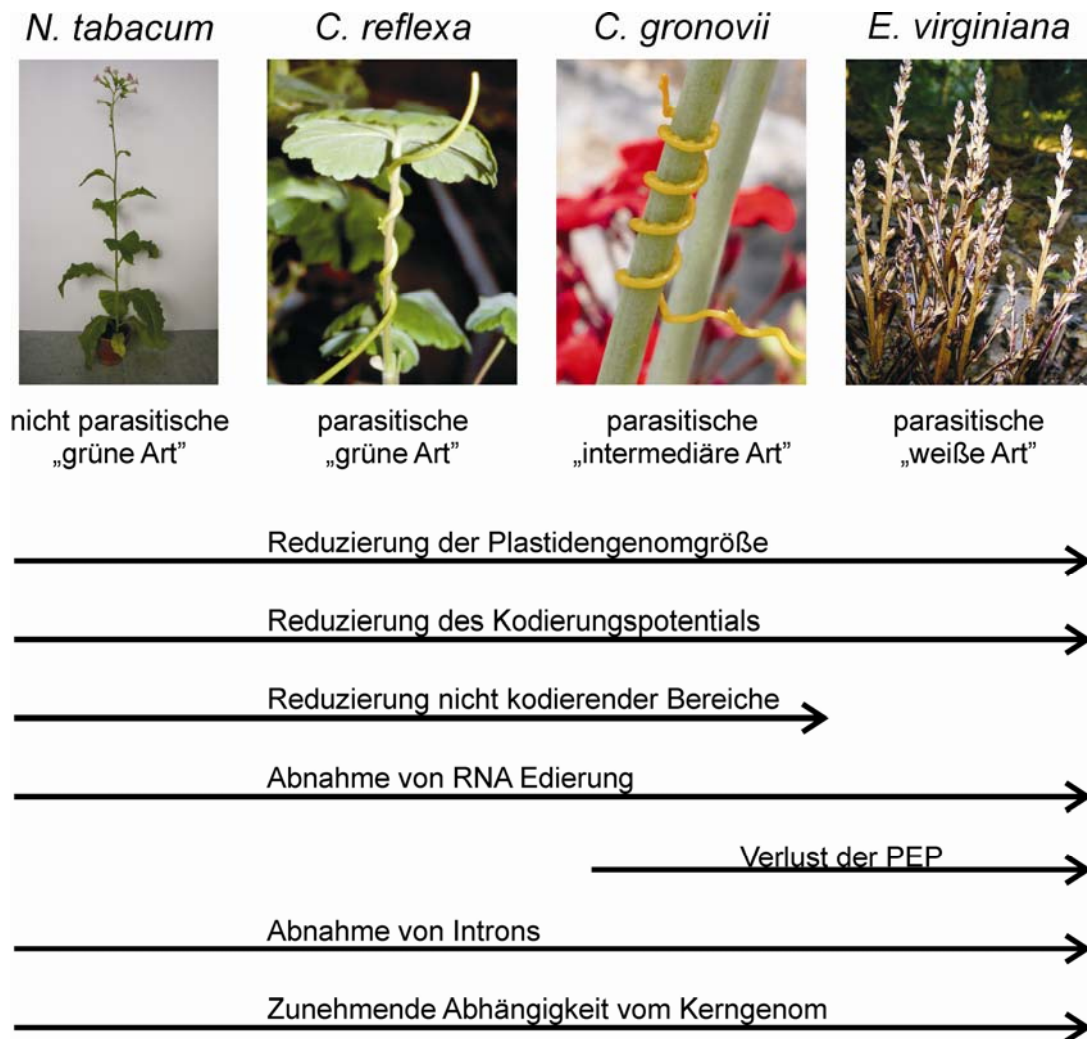
Die Anzahl der bisher identifizierten potentiellen Edierungsstellen bei *E. virginiana* ist mit insgesamt fünf im Vergleich zu *C. gronovii* noch einmal reduziert. Es kann jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass in *E. virginiana* noch mehr potentielle Edierungsstellen zu finden sind. Bei *C. gronovii* werden zwei Edierungsstellen (*rps2*-45 und *rps14*-27) nur partiell

ediert, welche bei *C. reflexa* vollständig prozessiert werden. Beide Edierungsstellen sind potentiell auch bei *E. virginiana* vorhanden, bisher jedoch nicht überprüft worden. Falls sich die Annahme bestätigen sollte, dass eine Abnahme der Edierungseffizienz bei parasitischen Pflanzen vorliegt, könnte ein Verlust der Edierung bei den entsprechenden Edierungsstellen in *E. virginiana* zu finden sein. Weiterhin wäre es interessant die *rps2-83* Edierungsstelle, die sowohl in *C. reflexa* als auch in *C. gronovii* nicht ediert wird, in *E. virginiana* zu untersuchen, um zu überprüfen ob diese dort ebenfalls nicht ediert wird. Ein vollständiger Verlust einer funktionsfähigen Edierungsmaschinerie kann allerdings für *E. virginiana* ausgeschlossen werden, da Edierung für eine Edierungsstelle in *rps12* an Aminosäureposition 74 beschrieben ist (Ems *et al.*, 1995). Die *rps14-50* Edierungsstelle, die in beiden *Cuscuta* Arten ediert wird, ist in *E. virginiana* ebenfalls als potentielle Edierungsstelle vorhanden. In beiden *Cuscuta* Arten wird das Cytosin im auf DNA Ebene kodierten Serinkodon (tCa) auf mRNA Ebene ediert und so das konservierte Leucinkodon (uUa) hergestellt. In *E. virginiana* ist an der entsprechenden Position auf DNA Ebene ein Prolinkodon (cCa) zu finden, welches durch C-U Edierung auf mRNA Ebene ebenfalls in ein Leucinkodon (cUa) umgewandelt werden könnte. Damit wären in *E. virginiana* nur zwei Edierungsstellen zu finden, einerseits die bereits beschriebene *rps12-74* (Ems *et al.*, 1995) und andererseits die noch nicht untersuchte *rps14-50* Edierungsstelle, welche in beiden untersuchten *Cuscuta* Arten ediert wird. Dies deutet eine Abnahme von plastidärer Edierung bei parasitisch lebenden Pflanzen an.

#### **4.5 Auswirkungen der parasitischen Lebensweise auf die Plastidengenome**

Mit zunehmender Abhängigkeit der parasitischen Pflanzen von deren Wirtspflanzen kommt es durch eine Reduzierung des Kodierungspotentials und der nicht kodierenden Bereiche zu einer zunehmenden Reduzierung der Plastiden-

genomgröße (siehe 4.1). Weiterhin ist eine massive Veränderung der Genexpression zu beobachten (siehe 4.2 – 4.4) und damit eine zunehmende Abhängigkeit der Plastide vom Kerngenom (Abb. 4-1).



**Abb. 4-1: Auswirkungen der parasitischen Lebensweise auf die Plastidengenome**  
 PEP: plastidär kodierte RNA Polymerase; Aufnahmen: *N. tabacum*: Peter Poltnigg,  
*C. reflexa* und *C. gronovii*: Kirsten Krause, *E. virginiana*: ©[Daniel Reed] -  
[www.2bntthewild.com](http://www.2bntthewild.com)

*C. reflexa* hat für eine parasitische Pflanze eine noch relativ hohe Photosyntheseleistung und kann daher als „grüne Art“ bezeichnet werden. Die Photosyntheserate überschreitet allerdings nicht den Kompensationspunkt und somit ist diese „grüne Art“ bereits in sehr hohem Ausmaß abhängig von der entsprechenden Wirtspflanze. Erstaunlich ist daher, dass sich sowohl die Struktur

als auch die Kodierungskapazität des Plastidengenoms nur wenig von dem photosynthetisch aktiver, autotropher Blütenpflanzen unterscheidet.

Bei der „intermediären Art“ *C. gronovii* hingegen, eine parasitische Art mit stark eingeschränkter Photosyntheseleistung, sind aufgrund der parasitischen Lebensweise bereits mehrere Veränderungen im Plastidengenom zu beobachten. Interessanterweise betrifft dies hauptsächlich nicht die Photosynthesegene. Anstatt dessen konnte im Plastidengenom mit zunehmender Anpassung an die parasitische Lebensweise eine zunehmende Deletion von Genen des genetischen Apparates beobachtet werden. Die „intermediäre Art“ *C. gronovii* ist bisher die einzige noch teilweise photosynthetisch aktive Landpflanze bei der ein Verlust der plastidär kodierten RNA Polymerase beobachtet werden konnte. Die Transkription der entsprechenden Gene scheint in Folge dieses Verlusts von kernkodierten RNA Polymerasen übernommen zu werden. Sowohl die Deletion von Genen des plastidären genetischen Apparates als auch der Verlust der plastidär kodierten RNA Polymerase deutet eine zunehmende Abhängigkeit der Plastide vom Kerngenom an. Eine weitere, bei photosynthetisch aktiven Pflanzen bisher noch nicht beschriebene Deletion betrifft das Gen *matK*. Dieses kodiert für einen putativen Spleißfaktor. Einhergehend mit dem Verlust von MatK sind im Plastidengenom von *C. gronovii* die entsprechenden Introns verloren gegangen, für deren Prozessierung dieser Faktor mitverantwortlich zu sein scheint. Somit scheint in diesem Fall die Deletion des plastidären Gens nicht durch einen Kernfaktor kompensiert zu werden, bzw. ist der funktionelle Transfer des Gens in das Kerngenom äußerst unwahrscheinlich.

Neben der veränderten Transkription und dem Spleißen von mRNAs in den Plastiden der parasitischen Pflanzen ist noch ein weiterer Transkriptreifungsprozess betroffen. Mit zunehmender Anpassung an den Parasitismus konnte eine Abnahme von RNA Edierung in den plastidären Transkripten von *C. reflexa* und *C. gronovii* beobachtet werden. Zum einen ist an Edierungsstellen, die aus anderen Arten bekannt sind, bereits die edierte Form auf DNA Ebene kodiert und Edierung an solchen Positionen daher nicht notwendig. Zum anderen werden aus

anderen Arten bekannte Edierungsstellen nicht oder weniger effizient ediert, was nach bisherigem Kenntnisstand zu einer stark eingeschränkten Funktion bis hin zum vollständigen Verlust der Funktion des entsprechenden Genprodukts führen kann. Ein solcher Funktionsverlust könnte dabei zum Beispiel ein Faktor sein, welcher zu einer Festigung der parasitischen Lebensweise beiträgt, da durch die parasitische Lebensweise eine Funktionsstörung möglicherweise toleriert werden kann.



## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Parasitismus bei Blütenpflanzen beeinflusst mit der Anpassung an diese Lebensweise sowohl das Erscheinungsbild der parasitischen Pflanze als auch die intrazelluläre Morphologie. So zeigen sich beispielsweise bei der Gattung *Cuscuta* deutliche strukturelle Veränderungen der Plastiden im Vergleich zu nicht parasitischen Pflanzen. Um einen Einblick in die genetische Adaptation an den Parasitismus zu gewinnen, wurden in dieser Arbeit zwei Plastidengenome von unterschiedlich stark an den Parasitismus angepassten Arten der Gattung *Cuscuta* sequenziert und mit bereits bekannten Sequenzen der Plastidengenome einer nicht parasitischen und photosynthetisch aktiven Art - *N. tabacum* - und einer parasitischen und photosynthetisch inaktiven Art - *E. virginiana* - verglichen.

Für die „grüne Art“ *C. reflexa* sind nur wenige Veränderungen im Plastidengenom zu finden, welche noch nicht bei photosynthetisch aktiven Pflanzen beobachtet werden konnten. Bei der „intermediären Art“ *C. gronovii* ist eine zunehmende Deletion an Genen im Plastidengenom zu beobachten und eine massive Veränderung der Genexpression. Bei der zum Vergleich hinzugezogenen „weißen Art“ *E. virginiana* sind bereits alle Photosynthesegene im Plastidengenom deletiert und damit ist die Fähigkeit Photosynthese zu betreiben verloren gegangen. Mit zunehmender Anpassung an eine rein parasitische Lebensweise scheint also auch für die Gattung *Cuscuta* eine Entwicklung hin zur vollständigen Deletion der Photosynthesegene und eine weitere Deletion an Genen, wie es in *E. virginiana* der Fall ist, denkbar.

## 6. ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	zweifach destilliert
Bp	Basenpaar(e)
Cg	<i>Cuscuta gronovii</i>
Cr	<i>Cuscuta reflexa</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
Ev	<i>Epifagus virginiana</i>
Indel	Insertion/Deletion
IR	engl. Abk. für: invertierte Region ( <i><u>i</u>nverted <u>r</u>ep<u>e</u>at</i> )
Kbp	Kilobasenpaar(e)
LSC	engl. Abk. für: große Einzelkopieregion ( <i><u>l</u>arge <u>s</u>ingle <u>c</u>opy region</i> )
mRNA	messenger RNA
NADP	Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat
NDH	NAD(P)H-Dehydrogenase
NEP	engl. Abk. für: kern kodierte RNA Polymerase ( <i><u>n</u>uclear <u>e</u>ncoded RNA <u>p</u>olymerase</i> )
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
ORF	engl. Abk. für: offener Leserahmen ( <i><u>o</u>pen <u>r</u>ead<u>i</u>ng <u>f</u>rame</i> )
PAA	Polyacrylamid
PCR	engl. Abk. für: Polymerasekettenreaktion ( <i><u>p</u>olymerase <u>c</u>hain <u>r</u>ea<u>c</u>tion</i> )
PEP	engl. Abkürzung für: plastidär kodierte RNA Polymerase ( <i><u>p</u>lastid <u>e</u>ncoded RNA <u>p</u>olymerase</i> )
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
rRNA	ribosomale RNA
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SSC	engl. Abk. für: kleine Einzelkopieregion ( <i><u>s</u>mall <u>s</u>ingle <u>c</u>opy region</i> )
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
tRNA	transfer RNA
UTR	engl. Abk. für: untranslatierte Region ( <i><u>u</u>ntransl<u>a</u>ted region</i> )
ycf	engl. Abk. für: hypothetischer chloroplastidärer Leserahmen ( <i><u>h</u>ypothetical <u>c</u>hloroplast <u>r</u>ead<u>i</u>ng <u>f</u>rame</i> )

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

**Allen JF** (1993) Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *J Theor Biol* **165**: 609-631

**Allen JF** (2003) The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**: 19-37; discussion 37-18

**Allison LA** (2000) The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie* **82**: 537-548

**Allison LA, Simon LD, Maliga P** (1996) Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *Embo J* **15**: 2802-2809

**Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815

**Asakura Y, Barkan A** (2006) Arabidopsis Orthologs of Maize Chloroplast Splicing Factors Promote Splicing of Orthologous and Species-specific Group II Introns. *Plant Physiol*

**Ausubel TM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K** (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience

**Benne R, Van den Burg J, Brakenhoff JP, Sloof P, Van Boom JH, Tromp MC** (1986) Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* **46**: 819-826

**Berg S** (2003) Vergleichende Analysen zum plastidären Kodierungspotential und zur plastidären Genexpression von verschiedenen Arten der holoparasitisch lebenden Blütenpflanzengattung *Cuscuta*. Dissertation Christian-Albrechts-Universität Kiel

**Berg S, Krause K, Krupinska K** (2004) The *rbcl* genes of two *Cuscuta* species, *C. gronovii* and *C. subinclusa*, are transcribed by the nuclear-encoded plastid RNA polymerase (NEP). *Planta* **219**: 541-546

- Berg S, Krupinska K, Krause K** (2003) Plastids of three *Cuscuta* species differing in plastid coding capacity have a common parasite-specific RNA composition. *Planta* **218**: 135-142
- Bhattacharyya SN, Adhya S** (2004) The complexity of mitochondrial tRNA import. *RNA Biol* **1**: 84-88
- Birnboim HC, Doly J** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523
- Bock R, Kössel H, Maliga P** (1994) Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: the lack of RNA editing leads to a mutant phenotype. *Embo J* **13**: 4623-4628
- Bömmer D, Haberhausen G, Zetsche K** (1993) A large deletion in the plastid DNA of the holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa* concerning two ribosomal proteins (rpl2, rpl23), one transfer RNA (trnI) and an ORF 2280 homologue. *Curr Genet* **24**: 171-176
- Bonen L, Vogel J** (2001) The ins and outs of group II introns. *Trends Genet* **17**: 322-331
- Boudreau E, Turmel M, Goldschmidt-Clermont M, Rochaix JD, Sivan S, Michaels A, Leu S** (1997) A large open reading frame (orf1995) in the chloroplast DNA of *Chlamydomonas reinhardtii* encodes an essential protein. *Mol Gen Genet* **253**: 649-653
- Burrows PA, Sazanov LA, Svab Z, Maliga P, Nixon PJ** (1998) Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *Embo J* **17**: 868-876
- Casano LM, Martin M, Sabater B** (2001) Hydrogen peroxide mediates the induction of chloroplastic Ndh complex under photooxidative stress in barley. *Plant Physiol* **125**: 1450-1458
- Chateigner-Boutin AL, Hanson MR** (2002) Cross-competition in transgenic chloroplasts expressing single editing sites reveals shared cis elements. *Mol Cell Biol* **22**: 8448-8456
- Chateigner-Boutin AL, Hanson MR** (2003) Developmental co-variation of RNA editing extent of plastid editing sites exhibiting similar cis-elements. *Nucleic Acids Res* **31**: 2586-2594
- Chen MC, Cheng MC, Chen SC** (1993) Characterization of the promoter of rice plastid *psaA-psaB-rps14* operon and the DNA-specific binding proteins. *Plant Cell Physiol* **34**: 577-584

- Chitnis VP, Chitnis PR** (1993) PsaL subunit is required for the formation of photosystem I trimers in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett* **336**: 330-334
- Christopher DA, Mullet JE** (1994) Separate photosensory pathways co-regulate blue light/ultraviolet-A-activated psbD-psbC transcription and light-induced D2 and CP43 degradation in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplasts. *Plant Physiol* **104**: 1119-1129
- Chumley TW, Palmer JD, Mower JP, Fourcade HM, Calie PJ, Boore JL, Jansen RK** (2006) The complete chloroplast genome sequence of *Pelargonium x hortorum*: organization and evolution of the largest and most highly rearranged chloroplast genome of land plants. *Mol Biol Evol* **23**: 2175-2190
- Corneille S, Lutz K, Maliga P** (2000) Conservation of RNA editing between rice and maize plastids: are most editing events dispensable? *Mol Gen Genet* **264**: 419-424
- De Santis-Maciossek G, Kofer W, Bock A, Schoch S, Maier RM, Wanner G, Rüdiger W, Koop HU, Herrmann RG** (1999) Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes rpoA, B and C1: molecular biology, biochemistry and ultrastructure. *Plant J* **18**: 477-489
- Delavault P, Thalouarn P** (1994) Plastid genome evolution in Orobanchaceae and other holoparasites. Pieterse, A.H., Verkleij, J.A.C and ter Borg, S.J. (Eds.), *Proceedings of the 3rd International Workshop on Orobanche and related Striga research*. Amsterdam, The Netherlands
- dePamphilis CW, Palmer JD** (1990) Loss of photosynthetic and chlororespiratory genes from the plastid genome of a parasitic flowering plant. *Nature* **348**: 337-339
- Douzery EJ, Snell EA, Baptiste E, Delsuc F, Philippe H** (2004) The timing of eukaryotic evolution: does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils? *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15386-15391
- Doyle J, Doyle L** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**
- Drescher A, Ruf S, Calsa T, Jr., Carrer H, Bock R** (2000) The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant J* **22**: 97-104
- Ems SC, Morden CW, Dixon CK, Wolfe KH, dePamphilis CW, Palmer JD** (1995) Transcription, splicing and editing of plastid RNAs in the nonphotosynthetic plant *Epifagus virginiana*. *Plant Mol Biol* **29**: 721-733

- Freyer R, Neckermann K, Maier RM, Kössel H** (1995) Structural and functional analysis of plastid genomes from parasitic plants: loss of an intron within the genus *Cuscuta*. *Curr Genet* **27**: 580-586
- Funk HT, Poltnigg P, Schmitz-Linneweber C, Tillich M** (2004) Transcript polishing in higher plant plastids by RNA editing. *Endocytobiosis and Cell Res.* **15**: 491-503
- Gott JM, Emeson RB** (2000) Functions and mechanisms of RNA editing. *Annu Rev Genet* **34**: 499-531
- Haberhausen G, Valentin K, Zetsche K** (1992) Organization and sequence of photosynthetic genes from the plastid genome of the holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa*. *Mol Gen Genet* **232**: 154-161
- Haberhausen G, Zetsche K** (1992) Nucleotide sequence of the *rbcl* gene and the intergenic promoter region between the divergently transcribed *rbcl* and *atpB* genes of *Ipomoea purpurea* (L.). *Plant Mol Biol* **18**: 823-825
- Haberhausen G, Zetsche K** (1994) Functional loss of all *ndh* genes in an otherwise relatively unaltered plastid genome of the holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa*. *Plant Mol Biol* **24**: 217-222
- Hajdukiewicz PT, Allison LA, Maliga P** (1997) The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *Embo J* **16**: 4041-4048
- Hattori M, Miyake H, Sugita M** (2007) A Pentatricopeptide repeat protein is required for RNA processing of *clpP* Pre-mRNA in moss chloroplasts. *J Biol Chem* **282**: 10773-10782
- Hedtke B, Borner T, Weihe A** (1997) Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* **277**: 809-811
- Hedtke B, Borner T, Weihe A** (2000) One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep* **1**: 435-440
- Hedtke B, Meixner M, Gillandt S, Richter E, Borner T, Weihe A** (1999) Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants in vivo. *Plant J* **17**: 557-561
- Herrmann RG** (1997) Eukaryotism, towards a new interpretation. Schenk H. E. A., Herrmann R. G., Jeon K. W., Müller N. E., and Schwemmler W., eds. (Heidelberg and New York, Springer)

- Hess WR, Börner T** (1999) Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int Rev Cytol* **190**: 1-59
- Hess WR, Hoch B, Zeltz P, Hübschmann T, Kössel H, Börner T** (1994) Inefficient rpl2 splicing in barley mutants with ribosome-deficient plastids. *Plant Cell* **6**: 1455-1465
- Hibberd JM, Bungard RA, Press MC, Jeschke WD, Scholes JD, Quick WP** (1998) Localization of photosynthetic metabolism in the parasitic angiosperm *Cuscuta reflexa*. *Planta* **205**: 506-513
- Hibberd JM, Jeschke WD** (2001) Solute flux into parasitic plants. *J Exp Bot* **52**: 2043-2049
- Hiratsuka J, Shimada H, Whittier R, Ishibashi T, Sakamoto M, Mori M, Kondo C, Honji Y, Sun CR, Meng BY, et al.** (1989) The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol Gen Genet* **217**: 185-194
- Hirose T, Kusumegi T, Tsudzuki T, Sugiura M** (1999) RNA editing sites in tobacco chloroplast transcripts: editing as a possible regulator of chloroplast RNA polymerase activity. *Mol Gen Genet* **262**: 462-467
- Hirose T, Sugiura M** (1997) Both RNA editing and RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast ndhD mRNA: a possible regulatory mechanism for the expression of a chloroplast operon consisting of functionally unrelated genes. *Embo J* **16**: 6804-6811
- Hirose T, Sugiura M** (2001) Involvement of a site-specific trans-acting factor and a common RNA-binding protein in the editing of chloroplast mRNAs: development of a chloroplast in vitro RNA editing system. *Embo J* **20**: 1144-1152
- Hoffer PH, Christopher DA** (1997) Structure and blue-light-responsive transcription of a chloroplast psbD promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **115**: 213-222
- Horvath EM, Peter SO, Joet T, Rumeau D, Cournac L, Horvath GV, Kavanagh TA, Schafer C, Peltier G, Medgyesy P** (2000) Targeted inactivation of the plastid ndhB gene in tobacco results in an enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure. *Plant Physiol* **123**: 1337-1350
- Hübschmann T, Hess WR, Börner T** (1996) Impaired splicing of the rps12 transcript in ribosome-deficient plastids. *Plant Mol Biol* **30**: 109-123

- Jenkins BD, Barkan A** (2001) Recruitment of a peptidyl-tRNA hydrolase as a facilitator of group II intron splicing in chloroplasts. *Embo J* **20**: 872-879
- Jenkins BD, Kulhanek DJ, Barkan A** (1997) Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors. *Plant Cell* **9**: 283-296
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirose M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S** (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement). *DNA Res* **3**: 185-209
- Kapoor S, Suzuki JY, Sugiura M** (1997) Identification and functional significance of a new class of non-consensus-type plastid promoters. *The Plant Journal* **11**: 327-337
- Kapoor S, Wakasugi T, Deno H, Sugiura M** (1994) An atpE-specific promoter within the coding region of the atpB gene in tobacco chloroplast DNA. *Curr Genet* **26**: 263-268
- Knoop V, Kloska S, Brennicke A** (1994) On the identification of group II introns in nucleotide sequence data. *J Mol Biol* **242**: 389-396
- Kofer W, Koop HU, Wanner G, Steinmüller K** (1998) Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J and K of the plastid NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase in tobacco by polyethylene glycol-mediated plastome transformation. *Mol Gen Genet* **258**: 166-173
- Kotera E, Tasaka M, Shikanai T** (2005) A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* **433**: 326-330
- Krause K, Berg S, Krupinska K** (2003) Plastid transcription in the holoparasitic plant genus *Cuscuta*: parallel loss of the *rrn16* PEP-promoter and of the *rpoA* and *rpoB* genes coding for the plastid-encoded RNA polymerase. *Planta* **216**: 815-823
- Krause K, Maier RM, Kofer W, Krupinska K, Herrmann RG** (2000) Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome. *Mol Gen Genet* **263**: 1022-1030
- Kugita M, Yamamoto Y, Fujikawa T, Matsumoto T, Yoshinaga K** (2003) RNA editing in hornwort chloroplasts makes more than half the genes functional. *Nucleic Acids Res* **31**: 2417-2423



- Legen J, Kemp S, Krause K, Profanter B, Herrmann RG, Maier RM** (2002) Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *Plant J* **31**: 171-188
- Lerbs-Mache S** (1993) The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5509-5513
- Liere K, Link G** (1995) RNA-binding activity of the matK protein encoded by the chloroplast trnK intron from mustard (*Sinapis alba* L.). *Nucleic Acids Res* **23**: 917-921
- Liere K, Maliga P** (1999) In vitro characterization of the tobacco rpoB promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters. *Embo J* **18**: 249-257
- Maier RM, Neckermann K, Igloi GL, Kossel H** (1995) Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J Mol Biol* **251**: 614-628
- Maier RM, Zeltz P, Kössel H, Bonnard G, Gualberto JM, Grienemberger JM** (1996) RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol Biol* **32**: 343-365
- Margulis L** (1970) *Origin of Eucaryotic Cells*. In Yale University Press (New Haven)
- Martin W, Herrmann RG** (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol* **118**: 9-17
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D** (2002) Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12246-12251
- Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hapsmann S, Hasegawa M, Kowallik KV** (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* **393**: 162-165
- Matsubayashi T, Wakasugi T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Zaita N, Hidaka T, Meng BY, Ohto C, Tanaka M, Kato A, et al.** (1987) Six chloroplast genes (ndhA-F) homologous to human mitochondrial genes encoding components of the respiratory chain NADH dehydrogenase are actively expressed: determination of the splice sites in ndhA and ndhB pre-mRNAs. *Mol Gen Genet* **210**: 385-393

- McFadden GI** (1999) Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 513-519
- Meng BY, Matsubayashi T, Wakasugi T, Shinozaki K, Sugiura M, Hirai A, Mikami T, Kishima Y, Kinoshita T** (1986) Ubiquity of the genes for components of a NADH dehydrogenase in higher plant chloroplast genomes. *Plant Science* **47**: 181-184
- Meng BY, Tanaka M, Wakasugi T, Ohme M, Shinozaki K, Sugiura M** (1988) Cotranscription of the genes encoding two P700 chlorophyll a apoproteins with the gene for ribosomal protein CS14: determination of the transcriptional initiation site by in vitro capping. *Curr Genet* **14**: 395-400
- Meng BY, Wakasugi T, Sugiura M** (1991) Two promoters within the psbK-psbI-trnG gene cluster in tobacco chloroplast DNA. *Curr Genet* **20**: 259-264
- Mereschkowsky C** (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Centralb.* **25**: 593-604
- Mereschkowsky C** (1910) Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenesis, einre neuen Lehre von der Entstehung der Organismen. *Biol. Centralb.* **30**
- Michel F, Ferat JL** (1995) Structure and activities of group II introns. *Annu Rev Biochem* **64**: 435-461
- Michel F, Umesono K, Ozeki H** (1989) Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns--a review. *Gene* **82**: 5-30
- Millen RS, Olmstead RG, Adams KL, Palmer JD, Lao NT, Heggie L, Kavanagh TA, Hibberd JM, Gray JC, Morden CW, Calie PJ, Jermin LS, Wolfe KH (2001) Many parallel losses of *infA* from chloroplast DNA during angiosperm evolution with multiple independent transfers to the nucleus. *Plant Cell* **13**: 645-658
- Miyagi T, Kapoor S, Sugita M, Sugiura M** (1998) Transcript analysis of the tobacco plastid operon *rps2/atpl/H/F/A* reveals the existence of a non-consensus type II (NCII) promoter upstream of the *atpl* coding sequence. *Mol Gen Genet* **257**: 299-307
- Miyamoto T, Obokata J, Sugiura M** (2004) A site-specific factor interacts directly with its cognate RNA editing site in chloroplast transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 48-52
- Morden CW, Wolfe KH, dePamphilis CW, Palmer JD** (1991) Plastid translation and transcription genes in a non-photosynthetic plant: intact, missing and pseudo genes. *Embo J* **10**: 3281-3288

- Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, Tomizawa K, Endo T, Tasaka M, Shikanai T** (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* **429**: 579-582
- Nagashima A, Hanaoka M, Shikanai T, Fujiwara M, Kanamaru K, Takahashi H, Tanaka K** (2004) The multiple-stress responsive plastid sigma factor, SIG5, directs activation of the psbD blue light-responsive promoter (BLRP) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **45**: 357-368
- Nemoto Y, Kawano S, Kondoh K, Nagata T, Kuroiwa T** (1990) Studies on plastid-nuclei (nucleoids) in *Nicotiana tabacum* L. III. Isolation of chloroplast-nuclei from mesophyll protoplasts and identification of chloroplast DNA-binding proteins. *Plant and Cell Physiology* **31**: 767-776
- Neuhaus H, Link G** (1987) The chloroplast tRNA<sup>Lys</sup>(UUU) gene from mustard (*Sinapis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide. *Curr Genet* **11**: 251-257
- Nickrent DL** (2002) Parasitic Plants of the world. J. A. López-Sáez, P. Catalán & L. Sáez (eds.): Plantas parásitas de la Península Iberica e Islas Baleares. Mundi-Prensa Libros, S. A., Madrid 2002: 7-27
- Nickrent DL, Ouyang Y, Duff RJ, dePamphilis CW** (1997) Do nonasterid holoparasitic flowering plants have plastid genomes? *Plant Mol Biol* **34**: 717-729
- Ohme M, Kamogashira T, Shinozaki K, Sugiura M** (1985) Structure and cotranscription of tobacco chloroplast genes for tRNA<sup>Glu</sup>(UCC), tRNA<sup>Tyr</sup>(GUA) and tRNA<sup>Asp</sup>(GUC). *Nucleic Acids Res* **13**
- Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T, Shirai H, Sano T, Sano S, Umesono K, Shiki Y, Takeuchi M, Chang Z, Aota S, Inokuchi H, Ozeki H** (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete nucleotide sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* **322**: 572-574
- Okuda K, Nakamura T, Sugita M, Shimizu T, Shikanai T** (2006) A pentatricopeptide repeat protein is a site recognition factor in chloroplast RNA editing. *J Biol Chem* **281**: 37661-37667
- Oldenburg DJ, Bendich AJ** (2004) Most chloroplast DNA of maize seedlings in linear molecules with defined ends and branched forms. *J Mol Biol* **335**: 953-970
- Orozco EM, Jr., Chen LJ, Eilers RJ** (1990) The divergently transcribed *rbcl* and *atpB* genes of tobacco plastid DNA are separated by nineteen base pairs. *Curr Genet* **17**: 65-71

- Ostheimer GJ, Williams-Carrier R, Belcher S, Osborne E, Gierke J, Barkan A** (2003) Group II intron splicing factors derived by diversification of an ancient RNA-binding domain. *Embo J* **22**: 3919-3929
- Palmer JD** (1991) Plastid chromosomes: structure and evolution. Vasil, I. K., Bogorad, L. (Herausgeber). Cell culture and somatic cell genetics in plants, vol 7A, The molecular biology of plastids Academic Press, San Diego, : 5-53
- Peeters NM, Hanson MR** (2002) Transcript abundance supercedes editing efficiency as a factor in developmental variation of chloroplast gene expression. *Rna* **8**: 497-511
- Pfitzinger H, Weil JH, Pillay DT, Guillemaut P** (1990) Codon recognition mechanisms in plant chloroplasts. *Plant Mol Biol* **14**: 805-814
- Revill MJ, Stanley S, Hibberd JM** (2005) Plastid genome structure and loss of photosynthetic ability in the parasitic genus *Cuscuta*. *J Exp Bot* **56**: 2477-2486
- Rochaix JD** (1996) Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* **32**: 327-341
- Rodriguez-Ezpeleta N, Brinkmann H, Burey SC, Roure B, Burger G, Löffelhardt W, Bohnert HJ, Philippe H, Lang BF** (2005) Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr Biol* **15**: 1325-1330
- Saldanha R, Mohr G, Belfort M, Lambowitz AM** (1993) Group I and group II introns. *Faseb J* **7**: 15-24
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* **24**: 104-108
- Sasaki Y, Kozaki A, Ohmori A, Iguchi H, Nagano Y** (2001) Chloroplast RNA editing required for functional acetyl-CoA carboxylase in plants. *J Biol Chem* **276**: 3937-3940
- Schimper AFW** (1883) Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörner. *Bot Zeitung* **41**
- Schmitz-Linneweber C, Kushnir S, Babiychuk E, Poltnigg P, Herrmann RG, Maier RM** (2005) Pigment deficiency in nightshade/tobacco cybrids is caused by the failure to edit the plastid ATPase alpha-subunit mRNA. *Plant Cell* **17**: 1815-1828
- Schmitz-Linneweber C, Maier RM, Alcaraz JP, Cottet A, Herrmann RG, Mache R** (2001) The plastid chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*): complete nucleotide sequence and gene organization. *Plant Mol Biol* **45**: 307-315

- Schmitz-Linneweber C, Regel R, Du TG, Hupfer H, Herrmann RG, Maier RM** (2002) The plastid chromosome of *Atropa belladonna* and its comparison with that of *Nicotiana tabacum*: the role of RNA editing in generating divergence in the process of plant speciation. *Mol Biol Evol* **19**: 1602-1612
- Shiina T, Tsunoyama Y, Nakahira Y, Khan MS** (2005) Plastid RNA polymerases, promoters, and transcription regulators in higher plants. *Int Rev Cytol* **244**: 1-68
- Shikanai T, Endo T, Hashimoto T, Yamada Y, Asada K, Yokota A** (1998) Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9705-9709
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H, Sugiura M** (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *Embo J* **5**: 2043-2049
- Sriraman P, Silhavy D, Maliga P** (1998) The phage-type PclpP-53 plastid promoter comprises sequences downstream of the transcription initiation site. *Nucleic Acids Res* **26**: 4874-4879
- Stefanovic S, Olmstead RG** (2005) Down the slippery slope: plastid genome evolution in *Convolvulaceae*. *J Mol Evol* **61**: 292-305
- Stoebe B, Kowallik KV** (1999) Gene-cluster analysis in chloroplast genomics. *Trends Genet* **15**: 344-347
- Subramanian AR** (1993) Molecular genetics of chloroplast ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci* **18**: 177-181
- Sugita M, Sugiura M** (1984) Nucleotide sequence and transcription of the gene for the 32,000 dalton thylakoid membrane protein from *Nicotiana tabacum*. *Mol Gen Genet* **195**
- Sugiura C, Kobayashi Y, Aoki S, Sugita C, Sugita M** (2003) Complete chloroplast DNA sequence of the moss *Physcomitrella patens*: evidence for the loss and relocation of *rpoA* from the chloroplast to the nucleus. *Nucleic Acids Res* **31**: 5324-5331
- Sugiura M** (1995) The chloroplast genome. *Essays Biochem* **30**: 49-57
- Thalouarn P, Theodet C, Russo N, Delavault P** (1994) The reduced plastid genome of a non-photosynthetic angiosperm *Orobancha hederæ* has retained the *rbcl* gene. *Plant Physiol Biochem* **32**: 233-242

- Thomas F, Massenet O, Dorne AM, Briat JF, Mache R** (1988) Expression of the rpl23, rpl2 and rps19 genes in spinach chloroplasts. *Nucleic Acids Res* **16**: 2461-2472
- Till B, Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Barkan A** (2001) CRS1 is a novel group II intron splicing factor that was derived from a domain of ancient origin. *Rna* **7**: 1227-1238
- Tillich M, Funk HT, Schmitz-Linneweber C, Poltnigg P, Sabater B, Martin M, Maier RM** (2005) Editing of plastid RNA in *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Plant J* **43**: 708-715
- Tillich M, Schmitz-Linneweber C, Herrmann RG, Maier RM** (2001) The plastid chromosome of maize (*Zea mays*): update of the complete sequence and transcript editing sites. *Maize Genet Corp News Letters* **75**: 42-44
- van der Kooij TA, Krause K, Dörr I, Krupinska K** (2000) Molecular, functional and ultrastructural characterisation of plastids from six species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. *Planta* **210**: 701-707
- van der Kooij TA, Krupinska K, Krause K** (2005) Tocochromanol content and composition in different species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. *J Plant Physiol* **162**: 777-781
- Vera A, Hirose T, Sugiura M** (1996) A ribosomal protein gene (rpl32) from tobacco chloroplast DNA is transcribed from alternative promoters: similarities in promoter region organization in plastid housekeeping genes. *Mol Gen Genet* **251**: 518-525
- Vera A, Matsubayashi T, Sugiura M** (1992) Active transcription from a promoter positioned within the coding region of a divergently oriented gene: the tobacco chloroplast rpl32 gene. *Mol Gen Genet* **233**: 151-156
- Vera A, Sugiura M** (1995) Chloroplast rRNA transcription from structurally different tandem promoters: an additional novel-type promoter. *Curr Genet* **27**: 280-284
- Vogel J, Börner T, Hess WR** (1999) Comparative analysis of splicing of the complete set of chloroplast group II introns in three higher plant mutants. *Nucleic Acids Res* **27**: 3866-3874
- Vogel J, Hübschmann T, Börner T, Hess WR** (1997) Splicing and intron-internal RNA editing of trnK-matK transcripts in barley plastids: support for MatK as an essential splice factor. *J Mol Biol* **270**: 179-187

- Wakasugi T, Hirose T, Horihata M, Tsudzuki T, Kossel H, Sugiura M** (1996) Creation of a novel protein-coding region at the RNA level in black pine chloroplasts: the pattern of RNA editing in the gymnosperm chloroplast is different from that in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8766-8770
- Wakasugi T, Sugiura M, Tsudzuki T, Sugiura M** (1998) Updated Gene Map of Tobacco Chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**: 231-241
- Wakasugi T, Tsudzuki J, Ito S, Nakashima K, Tsudzuki T, Sugiura M** (1994) Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 9794-9798
- Wimpee CF, Morgan R, Wrobel R** (1992) An aberrant plastid ribosomal RNA gene cluster in the root parasite *Conopholis americana*. *Plant Mol Biol* **18**: 275-285
- Wimpee CF, Morgan R, Wrobel RL** (1992) Loss of transfer RNA genes from the plastid 16S-23S ribosomal RNA gene spacer in a parasitic plant. *Curr Genet* **21**: 417-422
- Wimpee CF, Wrobel RL, Garvin DK** (1991) A divergent plastid genome in *Conopholis americana*, an achlorophyllous parasitic plant. *Plant Mol Biol* **17**: 161-166
- Wolfe KH, Morden CW, Ems SC, Palmer JD** (1992) Rapid evolution of the plastid translational apparatus in a nonphotosynthetic plant: loss or accelerated sequence evolution of tRNA and ribosomal protein genes. *J Mol Evol* **35**: 304-317
- Wolfe KH, Morden CW, Palmer JD** (1992) Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10648-10652
- Xu Q, Hoppe D, Chitnis VP, Odom WR, Guikema JA, Chitnis PR** (1995) Mutational analysis of photosystem I polypeptides in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Targeted inactivation of *psaI* reveals the function of *psaI* in the structural organization of *psaL*. *J Biol Chem* **270**: 16243-16250
- Yamano Y, Ohyama K, Komano T** (1984) Nucleotide sequences of chloroplast 5S ribosomal RNA from cell suspension cultures of the liverworts *Marchantia polymorpha* and *Jungermannia subulata*. *Nucleic Acids Res* **12**: 4621-4624
- Yao WB, Meng BY, Tanaka M, Sugiura M** (1989) An additional promoter within the protein-coding region of the *psbD-psbC* gene cluster in tobacco chloroplast DNA. *Nucleic Acids Res* **17**

**Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G, Bhattacharya D** (2004) A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol* **21**: 809-818

**Zapata JM, Guera A, Esteban-Carrasco A, Martin M, Sabater B** (2005) Chloroplasts regulate leaf senescence: delayed senescence in transgenic *ndhF*-defective tobacco. *Cell Death Differ* **12**: 1277-1284

**Zito F, Kuras R, Choquet Y, Kössel H, Wollman FA** (1997) Mutations of cytochrome *b6* in *Chlamydomonas reinhardtii* disclose the functional significance for a proline to leucine conversion by *petB* editing in maize and tobacco. *Plant Mol Biol* **33**: 79-86



## 8. ANHANG

Primername	Primersequenz
16s-cus1	TGGAAGTCATCAGTTCGAGC
16s-cus2	AAGGCAATGATCAGTAGCTG
16s-cus3	TGACTTGACGTCATCCTCAC
16s-cus4	TCTACCACTGAGCTAATAGC
313rev	TTAAATGTTGATGGAAAAGAACC
3'exrpl2Cus	AAGCTGCTCAGCAACAGTCG
3'petGgron	AGGTTCAAATCCTACAGAGC
3'petGrefl	TATCTGAATCTTAAATTGAC
3'psbLgron	CTAATGGAATGCCTATTATC
3'psbLrefl	CGAATGGGCTAAGAGAATGC
3'rpl20revgron	TAATGAAATTCCGCATAAAC
3'rps12ex2Cus	TCAAATCCAGAGGTTAATCG
3'rps12forCus	AAACCAAACCTCTGCCTTACG
3'rps12intodo	GAATTCTATATGTATCTATG
3'rps12outCus	TGGGGTTTGATTACATTGAC
3'rps12revCus	TTTTGGCTTTTTTACCCCAT
5'petLgron	CCTTTTGGGTGAATGGTTCG
5'petLrefl	ATAGAAACTTCGGTAAATGC
5'psbEgron	TGAATATAAACATTACTACG
5'rpl2Cus	AAGGGTCAAGTGAAATCTGC
AatpB	GGCTATAGCTATGAGTGCTA
AatpE	GACCTTAAATCTTAGTGTACT
AatpH	GAATCCACTGATTTCTGCCG
accDCus	TTTAGAAGCGAAGATCACTC
accDCus2	ATAGATGGAATAGTCGTTTCG
accDCusfor	CTTAATATTGTCCTCGTAGC
accDCusrev	CCTAACATAGCAAACTAGC
accDCusrev2	AGTTATCTATCCAATTTTGC
accDforCus	CAGATAGAATTGAACTTTTCG
accDforCus2	ATGGCTAAAATCTCGTCTGC
accDforCus3	AACCCCTAAACTGGAAGAGC
accDforgron	ATCACCGGAAAAACATCTGC
accDreflseq	TGATTTTTTCCCGACTACG
accDreflseq2	TGTATTTGTGGCTTCAATGC
accDrevCus	AATAACTCACTAATAACG

ApetB	ATATGATTGGTTCGAAGAACG
ApetG	GATTGAAGTTTTTCTATTTG
ApetL	TTAGCGGCTTTAACTATAAC
ApsaJ	GAGATCTAAAAACATATCTCT
ApsbA	TTACTTGCGGTAGCTTGTTACA
ApsbB	GGTTTTTGATCCTTCTGATC
ApsbC	GGAGCAATGAACCTATTTGA
ApsbD	TGAACCCATTTTCATATGATG
ApsbF	GTTTATCGTTGGATGAACTG
ApsbI	TTCTTCACGTCCAGGATTAC
ApsbK	TTGCCAAACAAAGGCTAAGA
ApsbL	TACGACACAATCAAACCCGA
ApsbT	GGAAGCATTGGTTTATACAT
ArbcL	GGACTTACCAGCCTTGATCG
Arpl14	TGATTCAACCTCAGACCCAT
Arpl16	GAACCAGATTCCGTAAACAAC
Arpl22	GTCTGCTGACAAAGCACGAA
Arpl36	GAAAATAAGAGCTTCCGTTC
ArpoB	GTCAAAAGAAAATGCCATTTTG
ArpoC2	AGCTAAGCCTTATTTGGCCAC
Arps11	TACCGAAAATTAGTTCGCGT
Arps14	ATGGCAAGGAAAAGTTTGAT
Arps18	GGGATCGAATTGATTATAGA
Arps2	GTCATGGTACTAGGAAATGG
Arps4	GACCTCGTTTCAAAAAAATAC
Arps7	GTCACGTCGAGGTACTGCAG
Arrn16	GGTATCTGGGGAATAAGCAT
Arrn23	GGGAGTTGAAAATAAGCATA
Arrn4.5	GAGCCGTTTATCATTACGAT
Arrn5	TTCGATATTCTGGTGTCTTA
AT75'rps12	GATAATACGACTCACTATAGGGTTATTTTGGCTTTTTTACCCCAT
AT7atpA	GTAATACGACTCACTATAGGGAAATTACATTAGTAGGAATA
AT7atpB	GATAATACGACTCACTATAGGGCAAACCAACTCTCATACGAGC
AT7atpE	GATAATACGACTCACTATAGGGTTTGCTGAGCTTCTTGTTGGAT
AT7atpH	GTAATACGACTCACTATAGGGATTAAACAAAAGGATTCGCAA
AT7clpP	GATAATACGACTCACTATAGGGCGTGAGGGAATGCTAGACGTT
AT7ndhB	TAATACGACTCACTATAGGGAAATATAGGCCTGCCT
AT7orf99	GATAATACGACTCACTATAGGGACTGGAAGGATTCCTCTTTGG
AT7petD	GATAATACGACTCACTATAGGGATTTATCAATAGGTAATGTTGC
AT7psaA	GTAATACGACTCACTATAGGGCCCCCAAGTTAACTGGTACT
AT7psbA	GTAATACGACTCACTATAGGGCTAGCATATTGGAAGATCAAT
AT7psbB	GATAATACGACTCACTATAGGGTTTCAATATTTCCCATACG

---

AT7psbD	GTAATACGACTCACTATAGGGTAGAACCTCCTCAGGGGAAT
AT7psbL	GATAATACGACTCACTATAGGGTCTTAATTGAAGAAATAATTGGA
AT7psbN	GATAATACGACTCACTATAGGGCTCAGTACTTCAACTAGTC
AT7rpl20	GATAATACGACTCACTATAGGGTCGTTTCGAAATCATATAAAG
AT7rpoB	GTAATACGACTCACTATAGGGATCCAAAACCTTGAGATAATGG
AT7rpoC2	GTAATACGACTCACTATAGGGCTCGCTTCAGATATGAACTTTG
AT7rpoC2	GTAATACGACTCACTATAGGGCTCGCTTCAGATATGAACTTTG
AT7rps11	GATAATACGACTCACTATAGGGTCTTTTTTTTCGGAGGTCTAC
AT7rps2	GTAATACGACTCACTATAGGGATTGAGGATATGGCGTCAT
AT7rps4	GTAATACGACTCACTATAGGGATAATATTCTACGACTAGCAATTC
AT7rps8	GATAATACGACTCACTATAGGGCCAGATATAACACAAAATCTC
AT7rrn16	GATAATACGACTCACTATAGGGTTCCAAACTCAACGATGG
AT7rrn23	GATAATACGACTCACTATAGGGTTCCCTTAACCAAGCCAC
AT7rrn5	GATAATACGACTCACTATAGGGCTGGCGTCGAGCTATTTTTCC
AT7trnA-ugc	GATAATACGACTCACTATAGGGACTCGAACCGCTGACATCC
AT7trnEuuc	GTAATACGACTCACTATAGGGTACCCCCAGGGGAATTTCGAAT
AT7trnL-uaa	GTAATACGACTCACTATAGGGATAGAGGGACTTGAACCCT
AT7trnNguu	GATAATACGACTCACTATAGGGGAAGTAGGATTGGAACCTACGA
AT7trnSgcu	GTAATACGACTCACTATAGGGAAAAAATCAAGTCATCAACGG
AT7trnT-ugu	GTAATACGACTCACTATAGGGCTATCGGAATCGAACCGAT
AT7trnV-gac	GATAATACGACTCACTATAGGGCTTAGGGATAATCAGGCTC
AT7trnW-cca	GATAATACGACTCACTATAGGGCACGCTCTGTAGGAT
AT7trnYgua	GTAATACGACTCACTATAGGGATTTTTGGGCCGAGCTGGATT
AT7trnY-gua	GTAATACGACTCACTATAGGGATTTTTGGGCCGAGCTGGATT
AT7ycf15	GTAATACGACTCACTATAGGGATAGACGCCTGTTGGCATTCC
AT7ycf2.3'	GTAATACGACTCACTATAGGGCTAAGCCATCTCTGACG
atpACus	TTTCTACTTAAGGAACAAGC
atpAforCus	TTGGAAC TTGCACAATTTGC
atpAMittefor	GAGATCAGAAGCAAATTTGTGC
atpArevCus	CTACGACAATAGTATATTGC
atpArevCus2	ACCATAAATACGTACAATGC
atpBCus	GCTCTAACTCGATTATTTCC
atpBCus2	CCAATACATTCCATAATAGC
atpBCus3	TTTTCCCCCTGGCAAGATGC
atpBCusfor	ACCCCTGTACTATGAATACG
atpBCusrev	GAACCAGTAAATACTTCTGC
atpBfor_Cus	GTCAAGCAAAC TTTACAACG
atpBinCus	GACCCATTATCCTTCAAGTC
atpECus	AGTGGCAGAGACTAACTTGG
atpFATGgron	AGGATAATTTATGAAAGACG
atpFCus	TACACCAAGCACTACACTTAG
atpFCus2	CTCTTATAAATATAGCTGTC

---

atpFforP	ATGAAAAACGTAACCGATTTC
atpFgron	TTTGAGTGTTCCCAACATAC
atpFintCus	CGATTCATTTGGCTCTCACG
atpFrefl	TTTTATTGTTCCCAACATGC
atpH5'Cus	TAATTGACGTACGGATAAGC
atpHCus	CCTACGGTATAAAATAAAGAC
atpHCus2	CGATTCATTTGGCTCTCACG
atpHCus3	ACTCCAGGTCCAATAGAAGC
ATPHF5'	ACGAAATTAGTAATATTATCC
atpHF6revCus	GCTGTTTTACCGGTTTGTCTG
atpHforCus	TCTGCTGCTTCTGTGATTGC
atpIfor	TATCCGGTGTGGAAGTAG
atpIforCus	TCAGCGGCTTATTTCTATGC
atpIrev	TCAATGATGGCCCTCCATGG
atpIrevCus	TATTCAAATAAATTCTGACC
AtrnC-gca	TTTGTAGCATTTTTGGCGACA
AtrnC-gca	TTTGTAGCATTTTTGGCGACA
AtrnD-guc	ATTTCCCTGGGATTGTAGTT
AtrnF-gaa	GGGATAGCTCAGTTGGTAGA
AtrnGgcc	ACAAAAAATGCGGATATGG
AtrnG-ucc	CGAATAGCTTTGTAGATGATC
AtrnL-caa	TGGTGATGAAATGGTAGACACGCG
AtrnL-uaa	TGGTGATGAAATGGTAGACACGCG
AtrnN-guu	TCCTCAGTAGCTCAGTGGTA
AtrnRucu	GCGTCCATTGTCTAATGGAT
AtrnSgcu	ATGGGAGAGATGGCTGAGTG
AtrnYgua	AATTGATTCTTCTTGGGTGGA
Aycf2.23'	ATCGATATTGATGATAGTGAC
Aycf4	GCGATCAGAACATATATGGAT
Aycf5	AAGTATGATGATATTGGGCT
Aycf6	AGGGGACATAATTCATATGG
Aycf9	CTCTTGCTTTCCAATTGGCT
bkrev1	ATCTTGCTCAGACCAATAAA
cemACus	ATTAGAAGAATTCCTCTTCG
cemACus2	ACCACGATTCGGCCAGTTGC
cemACusrev	TTCGGATTGTCTAGTATTCC
cemACusseq	TATATACCAGGAGCAATACG
cemACusseq2	CCCTGGGGGATTTATGTAGC
cemCus	ACTCTAAAAGGCATGAAAGC
clpPAT2rev	TGAACCGCTACAAGATCAAC
clpPATrev	GTAATGATCCATCAACCCGC
clpPCus	CTATCAAAGCCAATCCAACC

clpPCusex1	ATTGGTGTTCCAAGAGTACG
clpPCusex3	AGAGYAACCCCTACAACATC
clpPCuseq	TGGGAATCATCTGGAATACC
clpPforCus	TTGGTGTCCAGGATGAGACC
clpPgron	CAGATACCCAAACCATATGC
clpPgronrev	TAGAAGCGGCCAGTCCAACG
clpPint	GGAATTTGGATTAGATCTCG
clpPintCus	AAGTACTCAAAGGTTGATGC
clpPintCus2	ACGCCTGGTATTCAATTTCC
clpPseq	CGGCTATTTGATCATTTACC
Cus2B2	ATAGTGCCCTACTAAGTCC
Cus2P1	GATCGAATCATTATATTGAC
CusB2	AGAAAATGACTTTATGATGC
cusg12	GATAAGGGGCTATCCATTGC
CusP1	GTACATCTATTTGTTACTGC
cuspcr2	GGTGTTCCCTTCAATGGGACC
cusPCR24	ATTTTCACACAAAGTTATCC
gron15rev	ACCCACCAAAGTATGAAAGC
gron16	AAATAACAAGCGTTCTTCAG
gron1out2	GCCGGTAGAGTCCTAAAAGC
gron3	AAGCCCCAAGTTGGCTATGC
hpl25'rev	CCTCTGGCATTACGACCT
HpsaArev3	AAGGTGAAAAATGGGGTTGC
HpsaArev3	AAGGTGAAAAATGGGGTTGC
IRfor	ACCCCCGCCTCAAGCTCTCG
IRodo1	CTGTCTCAACAAGAGCCTCG
IRodo2	AGGCCTCCCCAAAAGGTAACG
IRrev	GGCTTTATCATGGCGAAGTC
K6	TTAGGGCATCCCATTAGTAAA
K7	AAAAATATCCAAATACCAA
KdomXrev	CAAGAAAGTCGAAGTATATA
matKCus	AACTCGTGTAGAAAGAATCG
matKforrefl	TCCAAATCCAACCTAAAACG
matKHamrev	CTTGATACCTAACATAATGC
matKrevrefl	ATACCAAATCCGCCCTTTTCG
nb11	TTCATGCTTGTTTGAGTAATAGC
ndhBedIII	ATTTCTTGAAGCTCAATCTCTCCCCCGGAT
ndhBintCus	TAAGTCATTACAACCACTG
ndhBP12	GATATACCAAGAAAGATGTACG
orf105Cus	AATCCCCCGGTTTATCTAGC
orf350Cus	CCAAATCATAAGGCAGCAGC
orf70ACusfor	ATGGGGTACCTTTTCATCG

orf70ACusrev	CTTATAAGAAAAGTGGATGC
orf70BCus	TGCGTAAAGCCCCGCGGTAGC
orf70Bodo	AGTTCTTATGTGTTTCCACG
orf74Cus	GGGGATCTTTTTCCCATACG
orf99Cus	ACTGGAAGGATTCTCTTTGG
out_ssc_cus	AATCACTTAGGGGAAAATGC
outsscCus2	GTATGACAGGGTTCCCCTGC
outsscCus3	TTGAGTAGAGTTGTTCGTGC
PCR3	GGAATGACCCTTTCTTCAGC
petA3'for	ACAGTTTGAGAAGGTTCAATTG
petACus	TGTGCCAAAATAATTGATGC
petACus2	TGATCGCATTTCCCCTGAGC
petACusfor	TCCCATTCTTTCCCCGGACC
petACusfor2	CCCGCTACTAAGAAGGATGC
petACusin	TTTTTATTCCAGCAAATAGC
petACusrev	TGCACTTGAAATGGATGTCC
petArevCus	GCCCGCCTATTATTAGCAGG
petB3'exCus	ATTAACCATCCAAAGTTAGC
petBATGgron	TTTCATTTCCGGAAAATGAG
petBATGrefl	CTGTACTTCCGGAATATGAG
petBexCus	ACCAAAATCGAGGTACTAGC
petBgronin	TATTTCAATTTGGCAGTTCC
petBintCus	TATTGAGATAGGTTCAATCC
petBintCus2	TTTTTAGGAACCCGGGCACG
petBrevgron	ATCATACTTGCCGACCATCG
petBrevrefl	CCCGAAATACCCTGTTTACG
petD/rpoA	ATTCTACATCAAATGTTCC
petD3'Cus	TTAATGGTTTCAATACCTGC
petD5'	CGAAATGAAATGGATTATGGGAG
petDATGCus	GATAAAATGGATTATGGGAG
petDCus	AAAAGGCCATAGAATTTTCC
petDCus2	TCGGACAATTTACGTTGACG
petDintCus	TAACTTGAGAGGGGTTTGC
petDintCus2	GTTCTTTTGCTTCTTGCTCG
petDrevgron	TAGGTAATATTGCCCCAACG
petDrevrefl	TTATCAATCGGTAATGTTGC
petGCus	ATGATTCTAATAGAAAAGC
petLinCus	CTGAATCTAATGAGTTAAAC
petLrevX	AAGTCGTATCTTGCTCAGACC
PrpoBfor	TGATATTTTAGTAGGTAAATTAAC
psA3'_2	CGGGTCTCTTTGTATGTGTTG
psaA/ycf3Cus	CGGATCTATTATGACATAGC

psaACus	TCGAAATCATGAGCATCAGC
psaACus2	ATAGCATACATATGGTGAGC
psaACus3	GGGCCATAAAGGTCTATACG
psaACusfor	GTTTAATGTGTCTCTTCAGC
psaACuspcr6	ATAGCAGATGAAAGAGAACG
psaAforCus	CAATTACAACCTGTCTTTGC
psaAforCus1	CAACTCAAATTCGGCCTAGC
psaAforCus2	AATATGCCGACTTTCTTACG
psaAforCus3	AACGCAACGGCTCCTGGTGC
psaAforCus4	GTTGCTCCTGCCTACTCACC
psaAforCus4neu	AGTTGCTCCTGCTACTCAGC
psaAforCus5	TTAACACCAGATTTAGCAGC
psaArevCus	TAAAGAAATTGGCGCTAACG
psaBCusfor	CTTAATAGCAGGTTGGTTGC
psaBCusfor2	GACTTTACTACTCAAGCTGC
psaBCusfor3	CCCAGTTTAATGAATCTTCC
psaBforCus	GATCCGCATTTTGGTCAACC
psaBforCus2	ATTGCACACCATCATTTAGC
psaJ_Cus	TCAAGGATAGATGTTGGTAAG
psaJinCus	GAATTATAAACCTTTCATAC
psbACus	CATAGCACTGAATAGGGAGC
psbACus2	GGTGCATAAGAATGTTGTGC
psbAforCus	TGAAGTTTCAGCTACAAACG
psbBCus	ACGAACATACCCTGGTCTCC
psbBCus2	TCCTTTTGCTGGATTATTGC
psbBCusfor	GGTTTTTGATCCTTCTGACC
psbBCusrev	AAGAAACAGTTACGCCTACC
psbBR	GGA ACTATGTGGTATGTT
psbBR4Cus	CTCAATGGCGTTAGTTATAG
psbC/DCus	GAGGAGTAGCAATTGATTCC
psbCCus	ATGGATTGTAAGTGTGGACG
psbCCus2	TGGGATCTGCGTGCTCCGTG
psbCCus3	TTTTCTGGCTTGACTATTCC
psbCCus4	ACCCCCAACCTAGAGTAGC
psbCforCus	TCTCTATTTGGTTTCACTGC
psbD/CCus2	GTTGGAACCTTAGAATAAGCC
psbD1Cus	CCATAAACAAATGATCGATCGC
psbDCus	CCAACAATCCGATATGGTGC
psbDCus2	CACCATGAATAGCACATAGC
psbDforCus	ACGACAATTTGAGCTTGCC
psbDforCus2	TCATGAAAACCTTATATTCC
psbDrevCus	TGTCAAACAAATCCTTTTCG

psbE.AT.for	ACAGGAGAACGTTCTTTTGC
psbECus	ATAACTGGCCGTTTTGATCC
psbF.AT.rev	CGTTGGATGAACTGCATTGC
psbHCus	GGACAATCTACTTTGACTCG
psbHCus2	GTGTCTTTATTCCAATCGTCGC
psbHforCus	GTACAGATAATTAGGCTGTC
psbHrev2	CTGGGTACGCCTTATATACC
psbHrevCus	GGTGGGCTCATTACTTGAAG
psbI/KCus	GGTTACTTACACTATAAACG
psbNforCus	GTTGAAGTAATAAGTCTACC
rbcLCus	TCCTGATTATGAAACCAAGC
rbcLCus2	AGGCTAATGTGTTTGTCTCC
rbcLCus3	TCAGCACTTCGTTTTGATCG
rbcLforCus	ATAAATCCCAAGCTGAAACC
rbcLforCus2	AGCCCGGAACTAGCGGCTGC
rbcLinCus	CTCTTTTCATATATCTAGTGC
rbcLout_cus	AAAGGGTAAAAGAATTGAGC
rbcLrevCus	TAGTTCAGGGCTCCATTTGC
rbcLrevCus2	AGATCTTCCAGACGTAAAGC
rpl14Cus	TAGTAGATTGTGTCTCACGC
rpl163'exCus	TACTGAAATCTATAATTTGC
rpl165'exCus	AGTCACACACTAAGCATAGC
rpl16ATGgron	TTTTTTATTGCTATGCTTAG
rpl16ATGrefl	ATTATCATTGCTATGCTTAG
rpl16Cus	GACCTGCTTCTATTTGTCTAG
rpl16gronrev	TCCATTTCATAAAGTATTCTG
rpl16intCus	ACTCTATATCAATCATATCG
rpl16intCus2	TCAAGAGCTTCAAGCCAATA
rpl16intCus3	ATGTCCAGTTCTGGAGTAGC
rpl16intCus4	CTATCGTTCCTATCACTTCG
rpl16intCus5	AAGTTCCGTTCGTTCCCATCG
rpl16revCus	CCTTCTCTTTACCTTCGATACC
rpl20Cus	TCGTTTCTATGGTTACTTCG
rpl20Cus2	GACCCTCGGAATTTTGATGC
rpl20Cusx	ATAATAGGTCTTTCACAACG
rpl20forodo	AAACGGGGATCTATAGCTCG
rpl20revodo	CCCTGTTGAGTAATAGTTCG
rpl22for_Cus	TGGTCAATTACTCTTCGTGC
rpl22forCus2	AATGGTTGGTCATACTATCG
rpl23Cus	ACATAAACCTTATAAATTCTG
rpl23Cus2	GGGTAATAGCTTTTAATAGC
rpl2ATGgron	TTATGATAATAAAATTATAC



rpl2Cus	TACGGGGTTCATAACTACTC
rpl2Cus2	ATATGACCCTAATAGAAACG
rpl2revgron	ACGAAGAATAAACTTATTGC
rpl32Cusrev	TTTTAGTGTTGTCCAAAGAC
rpl33_Cus	TCATCCAGAAGTTAATAAGG
rpl33Cus2	TTTTGATTTCTCCATGAAGC
rpl36Cus	TTTATGTTTCGGGTTAGAGC
rpoACus	GGTAATATGATATCTTCAGC
rpoACus2	ATGATAAAGTGGCTAAACTC
rpoACus3	AACAGGTTTTCTGGAAATCG
rpoBATGrefl	AGGATTTTGTAGGTTTCATCG
rpoBCus	ATAAAATCCATGGGCGTTCC
rpoBCus2	CTGAAATTCGACCCCATAGC
rpoBCus3	CCCCCTTTCATCTACAAGC
rpoBCusfor	AAGCGTATTCGGTCTGTAGC
rpoBCusrev	TCAATAACCCGACCTCTAGC
rpoBrefl	GTAACCCGAAAAAGGACTCG
rpoBreflseq1	CTTCTGAATTATATGTATCG
rpoBreflseq2	TTTTTCTCCTTATCACGCAG
rpoBrevP	GAAAATACCGGATCGCCACC
rpoC15'for	AATAATTTTTCTTCTATGATCG
rpoC1forCus	GGGCCTGGTCATCTGATACC
rpoC1intCus	TGTAAAGAGTAACATGAAGC
rpoC1revCus	GTCGATAAGCTCCAATTGC
rpoC1revCus2	TCTGACTCGTCTACCAAGC
rpoC1revCus3	AATTGTTCTCGGATAGCACC
rpoC2.5'for	GGGCCTGGTCATCTGATACC
rpoC2_2	TCGATTGGTTGAAAGGCTTG
rpoC2Cus	TTGATTTACCCATTCAAAGC
rpoC2Cus1	AGGATTTGGTTCATCCGACG
rpoC2Cusseq	AACTAACTATTTTCACCTCG
rpoC2for	AGAAATCAATTCATCATTCC
rpoC2forCus	AGAAATCAATTCATCATTCC
rpoC2forCus2	TGCTCGCTGAAGATTGGACC
rpoC2revCus	CGCAAATACTCACTTGTAGC
rpoC2revCus2	GTTATAAAACCTATCAATTTC
rpoC2seq	AAATGTCACTACTGTATCTC
rpogron	AATTGCTTATTCTAAGGTGC
rpogron2	GAACCAAATAACTTGATCC
rpogron3	TGAAAGGCGGGCTAAAATCC
rpogronrev	TCAAATTCCAAAAATACTCC
rps11forCus	AAAATCCCAGTTTCTATTGC

rps11revCus	ATAGTATTCTGTAAACTGGC
rps125'Cus	ATGCCAACTATTAAACAAC
rps12Cusfor	TGTATCGAGCCGTGAAAACC
rps12int3'Cus	TGAAAGATCTCCCTCCAAGC
rps12odo	GCATAATCGCATGGATAAGC
rps14Cusrev	CTTCCAGTCATAAAACAACG
rps14Cusrev2	AAACATCCATGCCCAGACTG
rps14forodo	ATATCGTTTGATTGCGCGAC
rps14revodo	CCAAAATCTCGATAGTTAGC
rps14upodo	TACTGATAGGGAAGTGAAGC
rps15/ycf1Cus	AAGGGCTCAAAATTCACCTG
rps15Cus	GGGAGGTAAGTCTCCGTATC
rps15CusATG	TCCATAGACGGAGGATAGAC
rps15Cusfor	GTAGGTTCCAGCGAAGTAGC
rps15Cusfor2	AATTTTACTTTGAATATTGC
rps15Cusrev	TAATACTATAGATTTAACG
rps16-for	GATAGACGGCTCATTGGGATTG
rps16infor	GCTAAATAAATGAAATTGC
rps16infor	GCTAAATAAATGAAATTGC
rps16intCus	AACAACTTCGTAAACATATC
rps16-rev	CTTGGCTCGACATCATTGGTTC
rps18Cus	TTCAATCCGAAGTCAAATTC
rps18Cus2	TATGAGTTTAATTTGTCAGC
rps18Cus3	ATTGAAATTATTCTTCAAGC
rps18forCusg	AAAGCCCGTATTCGAGAAGC
rps19Cus	AGCAATAAGTTTATTCTTCG
rps2Cus	TCAAAAACCAAATCACAAGC
rps2-for	AACGACCCTCACAAATTGCGAATC
rps2forCus	CCTAATCTATCCGATATTGC
rps2forodo	TGACAAAAAGATATTGGAAC
rps2-rev	GAGGCAGGAGTTCATTTTGGTCA
rps2revCus	AGATATGTTTGCAAGCGAGC
rps2revodo	TGAATACCCTTACGCTTTGC
rps3Cus	CCTGAGTCATTCTTTTATAGG
rps3Cus3	CGTATCTCTATTTACAAACG
rps3Cusrev	ATAAGTATGTTCAATCTTCG
rps3for	TACAGCTATGCCGTATCGTG
rps4Cus	AACCCCGAGATATTATTACG
rps4-for	CGACCCATTTACTATCTATTATTTG
rps4forCus	AGTGGATACGAACTGGATCG
rps4forodo	TTTTATTATGGTCTTACAG
rps4-rev	ACGGAAGTGATCTTAGAAACC

rps4revCus	AACTGCTTTTCTGTAAGACC
rps4revCus2	TTCTTACAACCTTGAGTTTCC
rps4revodo	TTATCCAAACGCATTTCAAG
rps7Cusfor	ACCAGAAATAGCATGGAACC
rps7for	ATGTCACGTCGAGGTACTGC
rps7forodo	TTAGAGGCAGCCCGAAAACG
rps7forodo2	CGAGTAACTCCCAAGATAGC
rps7rev	AAGCTCGATTTGCCTCTG
rps8Cus	CGAGCCCCGCTATTATCTGC
rps8Cus2	TTGCTAGATCCGATTATTCG
rps8Cus3	ATAATGTCACCAATATGAGC
rps8Cusrev	GATGGCGCAAAGTTAAGACC
rps8Cusrev2	CTCTCGGTCTGTAAGTATGC
rps8Cusrev3	TGTTTTCGCACGTTTTCAAG
rps8forCus	AAATGGTTAAAATTCCGTCC
rps8forCus2	GGCCCGACTAGAAGGAATCG
rps8forCus3	TTTTATCTTTTATGCTTTGC
rps8forodo	ATGGGTAGGGACACTATTGC
rrn16Cus	CTTACCAGGGCTTGACATGC
rrn16Cus2	ATAGTTGCATTACTTATAGC
rrn16Cus3	AGCATCGGCTAACTCTGTGC
rrn16odo	CGATGATTGGGGTTAAGTCG
rrn16outCus	TCTCGACGGTGAAGTAAGAC
rrn16revCus	CCGCCTGTCCAGGGTTGAGC
rrn23Cus	GGGAAACAGCCCGGATCACC
rrn23Cus2	TGAAGATGCGGACTACCTGC
rrn23Cusfor1	GAACAAGAAACCGTAAGCTC
rrn23Cusfor2	CTTGTCGGGTAAAGTTCCGAC
rrn23forCus	GGTGGGTCTTGCAAGTCAAGC
rrn23forCus2	AAGTTACGGGGCTATTTTGC
rrn23homrevA	TCCCAGGAAAAGCTCGAACG
rrn23odo	GATTTTAACTTACGTTTACG
rrn23revCus	CCAGGTTGTCTCTTGCTGC
rrn23revCus2	CACGGTAAACGCTGGGTAGC
S.psaJrev	AAACGATTAATCTCTATCAA
seqodo	TATACAACGTCCAAAATTTCG
seqodo2	CAAGTCGTCCTTAACTACAG
seqtrnQCus	TCATTACCTTGAAACTGACG
Srpl33for	GGCCAAGGGGAAAGATGTCCG
SrpoA	ATTCAAAAGGTCCAACAATGT
Srrn4.5rev	AGGATGCCTCAGCTGCATAC
ssc_gronfor	CGTTGGCTTTCTCGAAAATG

ssc_gronfor2	CATATACTTATTCAAATTGC
ssc_gronrev	CATTTTCGAGAAAGCCAACG
ssc_refl	ATAATATGTATAATTTATGC
ssc_refl2	ATTGACATATACAGATGTCG
sscodo	ATTGACGGGTAGTGTGAGC
sscreflseq	ACTGTTAAGTAACTGCAACG
sscreflseq2	TTCATAAGTTTCTGAGTCG
ST7psbF	GATAATACGACTCACTATAGGGCCCTAATGACTATAGATCGA
ST7trnRucu	GTAATACGACTCACTATAGGGCGTCCATTGTCTAATGGATA
ST7trnSgcu	GTAATACGACTCACTATAGGGTGGGAGAGATGGCTGAGTGG
ST7ycf6	GTAATACGACTCACTATAGGGGACATAATTCATATGGA
StrnHgug	GGGCGAACGACGGGAATTGA
StrnSgcu	AAAAAATCAAGTCATCAACG
T7psbE.ive.temp	GTAATACGACTCACTATAGGGCCCTATTCATTGCGGGTTGG
test3	TCTTTAACATCTATCCATCC
trnACus	GTTGTCCTGTAGTTGGATCC
trnCCus	AGATTCTTTCTAGCTGTTGC
trnC-gcarevx	AGGCGACACCCGGATTTGAAC
trnDgucCus	GTAGTTCAATTGGTCAGAGC
trnDgucrevX	CGGGACTGACGGGGCTCGAAC
trnF_Cus	GTGAAATAGCGTTGATTTCC
trnFCus2	CTCTACCGCCTGAGCTATCC
trnGrefl	AGCGGATAGCGGGAATCG
trnGrefl2	CGGGAATCGAACCCGCATCG
trnGuccfor	CGGGTATAGTTTAGTGGTAA
trnGuccforCus2	GCGGGTATAGTTTAGTG
trnGUCrevCus	GGAGCCGACTGAAACCAAAG
trnGuucintCus	TGAAATAAAGTTTTAGATCG
trnIgaurevCus	GGGCCATCCTGGACTTGAAC
trnlintCus	CGGAAGGATCGTACCATTCC
trnKCus	TGGTTGACGTTGACACGAGC
trnL3'exonCus	CCAACTAAGTTATCTCATCC
trnLexCus	GTCCCTCTATCCCCAGAAGC
trnLforCus	CACAACGAGATCTTCATCTC
trnLseq	TCTGGGGATAGAGGGACTTG
trnLuaaforCUs	GGATATGGCGAAATTGGTAG
trnLuagCus	TCTACCAATTTACCATAGC
trnM-caurevX	TACCTACTATTGGATTTGAAC
trnPodo	GGAGAGAGCCGTTGAGGTCG
trnPodo2	AACGGCTCTCTCCTTACTGC
trnQ-uugCus	AAGGCAACGGGTTTTTGGTCC
trnQ-uugrevX	CTGGGACGGAAGGATTCTGAACC

trnR(ACG)Cus	CACATCAACCTGTAACCTAATGG
trnRCusIR	ATTTATTAACCTCAACTAATC
trnSCus	CCAAGACGCAATCCCGAACC
trnSgcurevX	CGGAAAGAGAGGGATTCTGAAC
trnT-guurevX2	AGCCCCTTATCGGATTTGAAC
trnVCus	GGGTCTTTGAAATAGTTCAGATC
trnVCus2	CATTCTCCTTGAATCACAGC
trnV-for	AGGGCTATACGGACTCGAACCGTAG
trnVintCus	TCTTGAAATGAAACACTTCG
trnV-rev	TGGTAGAGCAACTCGTTTACACGCG
trnVuacforCus	CTATAGCTCAGTTGGTAGAG
trnVuacrevCus	TATACGGACTCGAACCGTAG
trnYGUAforCus	CGATGCCCCGAGTGGTTAATG
watchatpAfor	CTTATAATATACGACGACCCGTCAAACAAGCGCAAGCTTATC
WatpArev	GCGCTTGTTTGGACCAATCATCATAAATG
ycf15Cus	GGGGTAGAGTCGTGGAAACG
ycf15Cusfor	AAATTCTTCTGTGTTTCAGC
ycf1Cus	TTTTCTTGTAAGTGAATTGC
ycf1Cus2	ACAAGCTATTGGGACTTTGC
ycf1Cus3	TTGGAAAATAATACTAATGC
ycf1Cus4	AACTTACAATTAAGGACAAG
ycf1Cus5	CGAGAGACCTCGATAGAAGC
ycf1Cus6	ATTATCTATTGAGAAATTCG
ycf1Cusfor	TCTGGTTTAACAAATATAGC
ycf1Cusfor2	AGCGAAAGCAGTAGCTTTGC
ycf1Cusfor3	AAGTCCCCCGATGGTCATAC
ycf1Cusfor4	CAACGAGAACAAAAAGAACG
ycf1Cusfor5	CTGTTTTGCAGGAACCTTGAC
ycf1Cusrev	ATAAGAAATTCAACTTTAGC
ycf1Cusrev2	TAAACTCCATTAATTCCAGC
ycf1Cusrev4	GGTAATAGAATGTCTCTTCG
ycf1EndeCus	GGGAAAAAGTCAAAGGATGC
ycf1EndeCus2	AAACGATGAAAGTGAGGACG
ycf1revCus	TCTAGATTAGTCATACCAGC
ycf1revCus2	ATCCGTTTCACTTAGATTTCG
ycf1revCus3	TTTACCGCGACCCAGGACTC
ycf1revCus4	TATTCCTTGTGTGTGAAACG
ycf1seq1Cus	TTCTTCAATTTGTTGAAACG
ycf1seq2Cus	CTTATCCCCTTTCTTGAACG
ycf2Cus	TGAACATTTCTTTCTGAGC
ycf2Cus2	ACTCATTACATACTCGAACC
ycf2Cus3	ATGGGTTTGAGTCATAGTCC

ycf2Cus4	AGTTGACATTCATCAAAAGC
ycf2cus5	GTTCCATACTAACGGATTTCG
ycf2Cusfor	ACTGAACCCATAAAAGATCG
ycf2Cusfor2	GAAAGGAACCGTTTTGAATC
ycf2Cusrev	CTAAGTCATATAAGTCATAC
ycf2Cusrev2	GATCTGCTCACTTGGAATGC
ycf2Cusrev3	GAAGAAGAAATCCTGTAACG
ycf2Cusrev4	AGATGACGGAATCCTCAACG
ycf2Cusrev5	TCAGAAAATAGAATATGAGC
ycf2Cusrev6	ACTTGTGTGAAATGGTTTCG
ycf2forgron	CCAGTTATGTATGGATTTTCG
ycf2rev_cus	GTGATTGTCTGAGAATGAGC
ycf2revCus	AACTCCAGTAGTCTCTTTTCG
ycf2revgron	ACATTTTCGGACAAGATTCC
ycf3Cus	TTATTATCAAGCCATGCACC
ycf3Cus2	AGCCCCGTCTACGAATTTCC
ycf3Cus3	TAAAACAAATATGGGCATCG
ycf3Cusex1	AAGAGGCATTTACCTATTAC
ycf3Cusex3	GCTTGTTCAGTACTCAGC
ycf3Cusrev	CGTAATAAGATATTGGCTAC
ycf3intCus	GTTTCCTTCTTTGCTACAGC
ycf3intCus2	CTGTTGAAGTGATTAATTCC
ycf4/10Cus	ATAGATATGGGCTTTCATGC
ycf4Cusseq	TCAAAGTATCCTTCCCTCGC
ycf4forCus	TAAAAATAAACCCCTTTGC
ycf4revCus	AATATGAATTCTAAGGAACC
ycf4RT7	CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGGAATATGCGACGAT
ycf5Cus	TATGATGGTAATGGGCTACG
ycf5revCus	TTGCGGAATTAGTACTCTGC
ycf6Cus	TAGCAGCACTTCTAGAGTCC
ycf6Cus2	TGTCCCCTATCTCTATAACG
ycf6forCus	TTTTCCGAACGAAAAGAGTC
ycf9Cus	ATGAAACCTATGGCTCTTGC
ycf9outCus	CAATAGTAATACAGGTCTCC
Zagreb3Cus	GCACAATAACGAGCCAAAG
ZmrpoC2for	GGTGGCAGTTTGATACCACC

## Danksagung

Leider kann ich mich bei Prof. Dr. Rainer Maier nicht mehr persönlich bedanken, der mir die Möglichkeit gab meine Promotion in Marburg zu beginnen. Ohne Dich und Deine freundliche, besonnene und ruhige Art hätte ich diese Arbeit wahrscheinlich nie begonnen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Uwe G. Maier, der nach dem Tod von Rainer Maier mir die Möglichkeit gab meine Promotion fertig zu stellen und ohne dessen Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Weiterhin wäre diese Arbeit ohne die weiterführende finanzielle Unterstützung des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität Marburg nicht möglich gewesen.

Im Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer und Herrn Prof. Dr. Paul Galland als weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission.

Dr. Kirsten Krause möchte ich für ihr offenes Ohr, ihre Unterstützung und für ihre ständige Diskussionsbereitschaft danken, die so manches *Cuscuta* Problemchen gelöst hat und natürlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber gilt mein Dank insbesondere für die aufbauenden Worte in der Anfangsphase meiner Promotion und für die Vermittlung des *Cuscuta* Projektes.

Michi, ohne dich wäre der ein oder andere Tag im Labor und in Marburg nur halb so lustig und schön gewesen. Danke für die andauernde Diskussionsbereitschaft sowohl in wissenschaftlichen Dingen als auch bei sonstigen Problemchen. Und Sorry, ich habe lernen müssen auch wenn Scheren Import/Export Tillich nicht anwesend ist verschwinden diese .... und dann für immer ...

Bei Heidemarie Thierfelder möchte ich mich besonders für die große Hilfe beim Sequenzieren bedanken und für die freundliche Aufnahme und die Einführung im Labor in Marburg. Ingrid Meinhard sei gedankt für die fröhliche Stimmung im Labor und die immer sauber gespülten Flaschen, Bechergläser und was man sonst noch so im Labor benötigt und natürlich für die vielen gesteckten Spitzen. Weiterhin möchte ich mich bei Lucette und allen anderen neuen und alten Mitgliedern des Labors im EG bedanken.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Maier sei gedankt für die freundliche Aufnahme im Labor und auch für die eine oder andere Stunde nach der Laborarbeit. Besonders möchte ich mich bei Dr. Stefan Zauner bedanken, der immer ein offenes Ohr für alle Laborproblemchen hatte und natürlich für's Korrekturlesen dieser Arbeit.

An Peter ein ganz großes Dankeschön für seine große Geduld in letzter Zeit in der auch ich nicht immer gut aufgelegt war und natürlich für die vielen Korrekturen ...

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, die durch ihr Vertrauen, ihre Unterstützung, ihre Kraft und ihre Liebe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## **Lebenslauf**

Helena Funk  
Mainzer Gasse 30  
35037 Marburg

Email: helena.funk@gmx.de

### **Persönliche Daten**

\*12.09.1976 in München  
Familienstand: ledig, keine Kinder

### **Schulbildung**

1988-1997                      Nymphenburger Gymnasium, München  
Abschluss: Abitur

### **Akademische Ausbildung**

10/1997 – 12/2003              Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Hauptfach: physiologische Botanik  
Nebenfächer: Biochemie, Ökologie, systematische Botanik  
Thema der Diplomarbeit: Untersuchungen zur Evolution und Funktion des plastidär kodierten Leserasters *ycf1*  
Betreuer: PD Dr. Rainer Maier  
Abschluss: Diplom

ab 02/2004                      Promotion  
Titel der Dissertation: Auswirkungen der parasitischen Lebensweise auf die Plastidengenome von *Cuscuta reflexa* und *Cuscuta gronovii*

### **Gastaufenthalt an auswärtigen Instituten**

11/2005                          Kurzaufenthalt an der Universidad Alcalá de Henares, Departamento de Biología Vegetal, Spanien  
Koordinierung gemeinsamer Forschungsprojekte (gefördert durch den DAAD)

06/2003 – 08/2003              Praktikum im Labor von Prof. Dr. Matthias Wabl, Department of Microbiology and Immunology, UCSF, San Francisco



# ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Auswirkungen der parasitischen Lebensweise auf die Plastidengenome von *Cuscuta reflexa* und *Cuscuta gronovii*“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich bei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in ihrer jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, der 19.09.2007

Helena Tamara Funk